

Microreactor for performing polymerase chain reactions, requires only very small sample and is made of material stable during temperature cycling

Publication number: DE10106008

Publication date: 2001-09-06

Inventor: TSO JACQUELINE (US); SWEDBERG SALLY A (US);
WEBBER PAUL K (US)

Applicant: AGILENT TECHNOLOGIES INC (US)

Classification:

- international: **B01L3/00; B01L7/00; B81B1/00; G01N30/28;
G01N30/60; B01L3/00; B01L7/00; B81B1/00;
G01N30/00; (IPC1-7): C12M1/38; C12M1/36**

- european: B01L3/00C6M; B01L7/00D

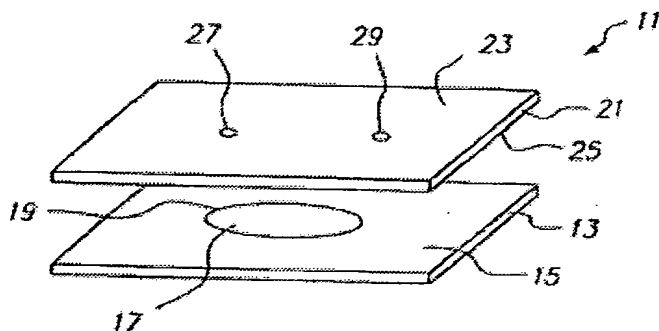
Application number: DE20011006008 20010209

Priority number(s): US20000502597 20000211

Report a data error here

Abstract of DE10106008

Apparatus for performing polymerase chain reaction (PCR) includes a reaction chamber, designed to hold 1-500 micro l of fluid, and is made of a material (A) that is thermally, chemically and mechanically stable under PCR conditions. Apparatus for performing polymerase chain reaction (PCR) includes a reaction chamber, designed to hold 1-500 micro l of fluid, and is made of a material (A) that is thermally, chemically and mechanically stable under PCR conditions. It comprises the chamber, defined by at least two internal surfaces; device for introducing PCR components into the chamber; device for removing PCR products from the chamber and device for controlling temperature in the chamber. Independent claims are also included for the following: (a) microreactor for amplifying DNA by PCR including a substrate (33) and covering plate (43) that, under PCR conditions, are stable and resist biological growth; (b) method for performing PCR, to amplify DNA in a sample, using a microreactor made of (A) and having one or more reaction chambers that hold 1-500 micro l of fluid; and (c) method for amplifying the amount of a specific DNA present in a small volume of sample fluid.





①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 06 008 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 M 1/38
C 12 M 1/36

②① Aktenzeichen: 101 06 008.4
②② Anmeldetag: 9. 2. 2001
④③ Offenlegungstag: 6. 9. 2001

③① Unionspriorität:
502597 11. 02. 2000 US

⑦① Anmelder:
Agilent Technologies, Inc. (n.d. Ges.d. Staates
Delaware), Palo Alto, Calif., US

⑦④ Vertreter:
Schoppe, Zimmermann, Stöckeler & Zinkler, 81479
München

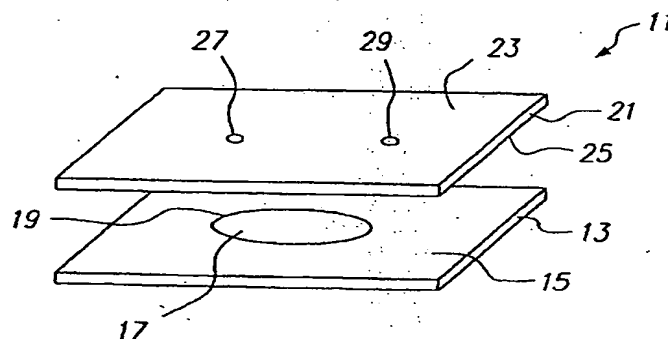
⑦② Erfinder:
Tso, Jacqueline, Fremont, Calif., US; Swedberg,
Sally A., Palo Alto, Calif., US; Webber, Paul K., Los
Altos, Calif., US

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ PCR-Mikroreaktor zum Vermehren von DNA unter Verwendung von Mikromengen eines Probenfluids

⑤⑦ Es wird ein Mikroreaktor (11) zum Ausführen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bei der Vermehrung von DNA unter Verwendung von Mikromengen eines Probenfluids geschaffen. Der Mikroreaktor ist eine Vorrichtung, die aus einer Reaktionszone, die durch zwei oder mehrere Innenoberflächen definiert ist und angepaßt ist, um etwa 1 bis 500 µl eines Fluids zu enthalten, einer Einrichtung zum Einbringen von PCR-Reaktionskomponenten in die Reaktionszone, einer Einrichtung zum Entfernen des PCR-Reaktionsproduktes aus der Reaktionszone und einer Einrichtung zum Steuern der Temperatur der Reaktionszone besteht, wobei die Vorrichtung aus einem Material hergestellt ist, das unter den Bedingungen, bei denen eine PCR-Reaktion durchgeführt wird, thermisch, chemisch und mechanisch stabil ist. Ein optimales Material ist Polyimid. Der Mikroreaktor kann mehr als eine Reaktionszone enthalten und kann zusätzlich andere Typen von Mikrostrukturen und Mikromerkmalen enthalten, wie z. B. Mikrokanäle, die bei chemischen und biochemischen Trennungen verwendet werden können.



DE 101 06 008 A 1

DE 101 06 008 A 1

Beschreibung

Diese Erfindung bezieht sich allgemein auf das Gebiet von miniaturisierten Vorrichtungen zum Durchführen chemischer und biochemischer Prozesse und insbesondere bezieht sich dieselbe auf einen neuartigen Mikroreaktor zum Durchführen einer DNS-Verstärkung bzw. Vermehrung unter Verwendung der Polymerase Kettenreaktion oder "PCR" (PCR = polymerase chain reaction).

Bei einem Probenanalysegerät ergeben kleinere Abmessungen im allgemeinen eine verbesserte Leistungsfähigkeit, charakteristisch und gleichzeitig reduzierte Herstellungs- und Analysekosten. Miniaturisierte Trennungssysteme liefern beispielsweise einen effektiveren Systementwurf, ergeben einen geringeren Aufwand und ermöglichen eine erhöhte Analysegeschwindigkeit, einen verringerten Proben- und Lösungsmittelverbrauch und die Möglichkeit einer erhöhten Erfassungswirksamkeit.

Dementsprechend sind mehrere Lösungsansätze in Verbindung mit der Miniaturisierung von Vorrichtung für eine Verwendung bei einer chemischen Analyse entwickelt worden, und zwar insbesondere bei der Mikrosäulenflüssigkeitschromatographie (μ LC; μ LC = micro column liquid chromatography), bei der Säulen mit Durchmessern von 100 bis 200 μ m verwendet werden, bei der Kapillarelektrophorese (CE; CE = capillary electrophoresis), bei der eine elektrophoretische Trennung in Kapillaren mit einem Durchmesser in der Größenordnung von 25 bis 100 μ m durchgeführt wird, und bei der Mikrokanalelektrophorese (MCE; MCE = microchannel electrophoresis), bei der eine Elektrophorese in einem Mikrokanal auf einem im wesentlichen planaren Substrat ausgeführt wird. Der herkömmliche Lösungsansatz bei der Miniaturisierungstechnologie, wie sie bei der CE und bei der μ LC angewendet wird, umfaßt die Verwendung eines Silizium enthaltenden Materials, d. h. eine Kapillare, die aus Quarzglas (fused silica), Quarz oder Glas hergestellt ist. Bei der MCE, einem attraktiven Verfahren, das im Zusammenhang mit Anwendungen mit einem hohen Durchsatz nützlich ist, und das eine Reduzierung der Gesamtsystemgröße relativ zu der CE ermöglicht, sind miniaturisierte Vorrichtung durch Siliziummikrobearbeitung oder Lithographietechniken, z. B. der Mikrolithographie, dem Formen und dem Ätzen, hergestellt worden. Siehe hierzu beispielsweise Fan et al. (1994) Anal. Chem. 66(1): 177-184; Manz et al., (1993) Adv. in Chrom. 33: 1-66; Harrison et al. (1993), Sens. Actuators, B 50(2): 107-116; Manz et al. (1991), Trends Anal. Chem. 10(5): 144-149; und Manz et al. (1990) Sensors and Actuators B (Chemical) B1(1-6): 249-255. Die Verwendung von Mikrobearbeitungstechniken, um miniaturisierte Trennungssysteme in Silizium herzustellen, liefert den praktischen Vorteil, daß eine Massenherstellung solcher Systeme ermöglicht wird, und es gibt mehrere Techniken, die durch die Mikroelektronikindustrie zum Herstellen von Mikrostrukturen aus Siliziumsubstraten nun entwickelt worden sind. Beispiele solcher Mikrobearbeitungstechniken, um miniaturisierte Trennungsvorrichtung auf Silizium- oder Borosilikatglas-Chips herzustellen, können den U.S.-Patenten US 5,194,133, erteilt an Clark, US 5,132,012, erteilt an Miura et al., 4,908,112, erteilt an Pace, und 4,891,120, erteilt an Sethi et al., entnommen werden.

Die Verwendung von Silizium enthaltenden Substraten, wie z. B. Quarzglas-, Quarz- und Glas, bei Mikroanalysevorrichtung ist in vielerlei Hinsicht problematisch. Siliziumdioxidsubstrate weisen beispielsweise hochenergetische Oberflächen auf und absorbieren stark viele Verbindungen, und zwar insbesondere Basen. Siliziumdioxidmaterialien gehen zudem zu einem erheblichen Ausmaß in Lösung, wenn dieselben mit basischen Lösungen verwendet werden. Darüber hinaus wird, wenn dieselben bei Elektrophoreseanwendungen verwendet werden, die Innenoberfläche einer Silikakapillare oder eines Silikamikrokanals bei einem basischen pH-Wert als ein Ergebnis der Deprotonierung der Oberflächensilanolgruppen (d. h. dieselben liegen in der Form von anionischen Si-O⁻Gruppen vor) negativ aufgeladen. Die Oberflächenladung an dem Inneren der Kapillare oder des Mikrokanals verschlimmert nicht nur das Problem der ungewollten Adsorption eines gelösten Stoffes, sondern moduliert ferner die Geschwindigkeit des Elektrosomoseflusses (ebenfalls als "Elektroendosmosefluß" oder EOF bezeichnet) an einer nichtmodifizierten Oberfläche, was wiederum die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit der durchgeführten chemischen Analyse beeinträchtigt. (Das heißt, daß die EOF-Geschwindigkeit eine Funktion des Zeta-Potentials ζ ist, das im wesentlichen durch die Oberflächenladung bestimmt wird.) Die Mikroherstellung unter Verwendung von Silizium an sich ist auf ähnliche Weise problematisch, insofern, als daß sich sogar unter milden Oxidationsbedingungen eine Silikaoberfläche auf einem Siliziumsubstrat bilden wird.

Aus den im vorhergehenden beschriebenen Gründen wäre es wünschenswert, Mikroanalyse- und andere miniaturisierte Vorrichtungen aus Materialien herzustellen, die nicht Silizium-basiert sind, wie z. B. unter Verwendung unaufwendiger und ohne weiteres verfügbarer Polymermaterialien. Es würde ferner wünschenswert sein, die Verwendbarkeit von Mikrovorrichtungen über die elektrophoretischen und chromatographischen Trennungstechniken hinaus auf andere Typen von chemischen Prozessen zu erweitern, nämlich auf Prozesse, die hohe Temperaturen, pH-Extremwerte, scharfe Reagenzien oder dergleichen einbeziehen können. Die vorliegende Erfindung liefert solche Mikroanalysevorrichtungen.

Das Gebiet, auf das sich die vorliegende Erfindung bezieht, ist der Bioanalyse zugeordnet. Eine wichtige Technik, die gegenwärtig bei der Bioanalyse und bei dem aufstrebenden Gebiet der Genomenforschung verwendet wird, ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; PCR = polymerase chain reaction) -Verstärkung bzw. Vermehrung der DNA bzw. DNS. Als ein Ergebnis dieses leistungsfähigen Werkzeuges ist es möglich, von ansonsten nicht erfaßbaren Mengen von DNA auszugehen und verstärkte bzw. vermehrte Mengen des Materials für eine anschließende Analyse zu erzeugen. Die Technik wird in dem U.S.-Patent Nr. 4,683,195, erteilt an Mullis et al., und in verwandten U.S.-Patenten Nr. 4,683,202, 4,800,159 und 4,965,188, erteilt an Mullis et al., beschrieben. Automatisierte Systeme zum Durchführen einer PCR sind bekannt, wie sie beispielsweise in den U.S.-Patenten Nr. 5,333,675 und 5,656,493, erteilt an Mullis et al., beschrieben sind. Die PCR verwendet eine sich wiederholende Folge von Schritten, um Kopien von Polynucleotidsequenzen zu erzeugen, die zwischen zwei Initiator- ("Primer"- bzw. "Starter"-) Sequenzen positioniert sind. Ausgehend von einer Schablone (Template), zwei Primersequenzen (mit einer Länge von üblicherweise etwa 15-30 Nucleotiden), einem PCR-Puffer, freien Deoxynucleosid-Tri-Phosphaten (dNTPs) und einer thermostabilen DNA-Polymerase (üblicherweise Taq-Polymerase) werden diese Komponenten gemischt und daraufhin erhitzt, um die doppelsträngige DNA zu trennen. Ein darauffolgender Abkühlungsschritt ermöglicht, daß die Primere zu komplementären Sequenzen an den einsträngigen DNA-Molekülen anlagern, die die Sequenz, die vermehrt werden soll, enthalten. Eine Nachbildung bzw. Replikation der Zielsequenz wird dann durch die DNA-Polymerase erzielt werden, die einen Strang der DNA erzeugt, die zu der Schablone

komplementär ist. Eine Wiederholung dieses Prozesses verdoppelt die Anzahl von Kopien der interessierende Sequenz, wobei mehrere Zyklen die Anzahl von Kopien exponentiell erhöhen.

Da die PCR ein wiederholtes Hin-Und-Her-Steuern zwischen höheren und niedrigeren Temperaturen erfordert, müssen PCR-Vorrichtungen aus Materialien hergestellt sein, die in der Lage sind, solchen Temperaturänderungen stand zu halten. Die Materialien müssen mechanisch und chemisch bei hohen Temperaturen stabil sein, und in der Lage sein, wiederholten Temperaturänderungen ohne eine mechanische Verschlechterung standzuhalten. Darüber hinaus müssen die Materialien mit der PCR-Reaktion selbst verträglich sein, und dürfen nicht die Polymerase verhindern oder DNA binden.

Bis heute verbleiben jedoch viele Probleme bei der Durchführung einer PCR in Mikrovorrichtungen. Ein Problem umfaßt die geringe thermische Stabilität vieler Materialien. Dies bedeutet, daß viele Materialtypen, wie z. B. Polymermaterialien, den hin-und-her-gesteuerten Temperaturen, die bei der PCR verwendet werden und sich typischerweise in dem Bereich von etwa 37°C bis 90°C befinden, ohne einen erheblichen oder vollständigen Verlust der mechanischen Integrität nicht standhalten können. Zusätzlich können auf einer Substratoberfläche Verunreinigungen vorhanden sein oder aus derselben auslaugen, was das präzise Gleichgewicht der geeigneten Inhaltsstoffe (Metallionen, Salze, Puffersysteme, Oligonucleotide, Primere und Polymerasen) beeinträchtigt, das für die PCR erforderlich ist, was wiederum nicht erfolgreiche Verstärkungs- bzw. Vermehrungsreaktionen ergibt. Ferner kann das Polymeraseenzym oder jede der Komponenten, die in die PCR-Reaktion involviert ist, an eine Mikrokanaloberfläche gebunden oder dort adsorbiert werden. Ein Kontakt zwischen der Polymerase und einer Substratoberfläche wird allgemein eine irreversible Denaturierung ergeben. Diese Typen von "Biobewuchs" sind wegen des sehr hohen Oberflächenbereichs-zu-Volumen-Verhältnisses insbesondere bei Kapillaren oder Mikrokanälen mit Mikrometer- oder Submikrometer-Abmessungen problematisch.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, einen Mikroreaktor, eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Durchführen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ein Verfahren zum Vermehren der Menge eines interessierenden DNA-Moleküls zu schaffen, die eine unaufwendigere Einsetzbarkeit aufweisen.

Diese Aufgabe wird durch einen Mikroreaktor gemäß Anspruch 15, eine Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und ein Verfahren gemäß Anspruch 34, 48 oder 59 gelöst.

Die vorliegende Erfindung erfüllt den im vorhergehenden erwähnten Bedarf in der Technik und liefert einen PCR-Mikroreaktor zum Vermehren einer DNA unter Verwendung von Mikromengen eines Proben-Fluids. Bei seiner einfachsten Ausführung umfaßt der PCR-Mikroreaktor eine Reaktionskammer, die durch zwei oder mehr Innenoberflächen definiert ist, eine Einrichtung zum Einbringen von PCR-Reaktionskomponenten in die Kammer, eine Einrichtung zum Entfernen des PCR-Reaktionsproduktes aus der Kammer und eine Einrichtung zum Steuern der Temperatur der Reaktionskammer, wobei die Vorrichtung aus einem Material hergestellt ist, das unter den Bedingungen, bei denen eine PCR-Reaktion durchgeführt wird, thermisch, chemisch und mechanisch stabil ist, und dieselbe eine Reaktionskammer verwendet, die angepaßt ist, um Fluid in dem Bereich von etwa 1 µl bis 500 µl zu enthalten. Bevorzugte Materialien sind diejenigen, die eine reduzierte Adsorption eines gelösten Stoffes, wie z. B. Biomolekülen, wie z. B. Proteinen, Nucleinsäuren, usw., zeigen und modifiziert, bedeckt bzw. beschichtet oder auf andere Weise behandelt werden können, um den Elektroosmosefluß zu optimieren.

Bei einem zweiten Ausführungsbeispiel der Erfindung umfaßt der PCR-Mikroreaktor folgende Merkmale: ein Substrat mit einer ersten und einer zweiten im wesentlichen planaren Oberfläche, die sich gegenüber liegen, wobei in der ersten planaren Oberfläche ein Hohlraum und zumindest ein Mikrokanal gebildet sind, und wobei der Hohlraum als eine Reaktionszone dient, die sich in Fluidkommunikation mit jedem Mikrokanal befindet; eine Abdeckplatte, die über der ersten planaren Oberfläche angeordnet ist, und die in Kombination mit dem Hohlraum eine Reaktionskammer und mit jedem Mikrokanal eine Mikrosäule definiert; und zumindest ein Einlaßtor und zumindest ein Auslaßtor, die mit der Reaktionskammer direkt oder indirekt kommunikativ verbunden sind und den Durchtritt von Fluid von einer externen Quelle in und durch die Reaktionskammer ermöglichen, wobei das Substrat und die Abdeckplatte aus einem Material bestehen, das thermisch und chemisch stabil und gegen Biobewuchs resistent ist.

Ein zusätzliches Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung liefert ein Verfahren zum Durchführen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um eine DNA in einer Probe zu vermehren bzw. zu verstärken, das das Erhitzen der Probe, um die doppelsträngige DNA in eine einzelsträngige DNA zu trennen, das Abkühlen der Probe, um eine Hybridisierung von Primeroligonucleotiden zu der einzelsträngigen DNA zu ermöglichen, das Replizieren der DNA unter Verwendung einer DNA-Polymerase und das Wiederholen der im vorhergehenden erwähnten Schritte, um den gewünschten Grad an Vermehrung zu erzielen, aufweist, wobei die PCR in einem Mikroreaktor durchgeführt wird, der aus einem Material besteht, das unter den Bedingungen, bei denen die PCR-Reaktion durchgeführt wird, thermisch, chemisch und mechanisch stabil ist und eine Reaktionskammer verwendet, die angepaßt ist, um etwa 1 µl bis 500 µl Fluid zu enthalten.

Bei einem weiteren Ausführungsbeispiel wird ein Verfahren zum Vermehren der Menge eines interessierenden DNA-Moleküls, das in einem kleinen Volumen eines Probenfluids enthalten ist, unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion geliefert, wobei das Verfahren folgende Schritte aufweist:

(a) Einbringen von bis zu etwa 10 µl eines Probenfluids in einen Mikroreaktor, wobei das Probenfluid das interessierende DNA-Molekül in doppelsträngiger Form, ein erstes und ein zweites Primermolekül, die zu entgegengesetzten Strängen des DNA-Moleküls komplementär sind, eine thermostabile DNA-Polymerase, freie Desoxynucleosidtriphosphate und einen PCR-Puffer enthält, und wobei der Mikroreaktor folgende Merkmale aufweist:

ein Substrat mit einer ersten und einer zweiten im wesentlichen planaren Oberfläche, die sich gegenüber liegen, wobei in der ersten planaren Oberfläche des Substrates ein Hohlraum gebildet ist, und wobei der Hohlraum als eine Reaktorzone dient,

eine Abdeckplatte, die über der ersten planaren Oberfläche angeordnet ist, wobei die Abdeckplatte in Kombination mit dem Hohlraum eine Reaktionskammer definiert, und

zumindest ein Einlaßtor und zumindest ein Auslaßtor, die sich mit der Reaktionskammer in Fluidkommunikation befinden, wobei die Tore den Durchtritt des Probenfluids von einer externen Quelle in und durch die Reaktionskam-

mögen ermöglichen, wodurch ein Fluidflußweg definiert wird,

wobei das Substrat und die Abdeckplatte aus einem Material bestehen, das thermisch stabil und gegen Biobewuchs resistent ist;

(b) Anlegen einer Antriebskraft an die Vorrichtung, um das Probenfluid entlang des Flußweges in die Reaktionskammer zu bewegen;

(c) Aufheizen des Probenfluids in der Reaktionskammer, um die doppelsträngige DNA in eine einzelsträngige DNA zu trennen;

(d) Abkühlen der Probe, um eine Hybridisierung der Primermoleküle zu entgegengesetzten Strängen der einzelsträngigen DNA und eine Replikation der einzelsträngigen DNA durch die DNA-Polymerase zu ermöglichen; und

(e) Wiederholen der Schritte (c) und (d), um den gewünschten Grad an Vermehrung zu erzielen.

Bei einem wiederum weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung wird ein Verfahren zum Vermehren der Menge eines interessierenden DNA-Moleküls, das in einem kleinen Volumen eines Probenfluids enthalten ist, unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion geliefert, wobei das Verfahren folgende Schritte aufweist:

(a) Einbringen von bis zu etwa 10 µl eines Probenfluids in den Mikroreaktor des zweiten Ausführungsbeispiels der Erfindung, wobei das Probenfluid das interessierende DNA-Molekül in doppelsträngiger Form, ein erstes und ein zweites Primermolekül, die zu entgegengesetzten Strängen des DNA-Moleküls komplementär sind, eine thermostabile DNA-Polymerase, freie Deoxynucleosidtriphosphate und einen PCR-Puffer enthält,

(b) Anlegen einer Antriebskraft an die Vorrichtung, um das Probenfluid entlang des Flußweges in die Reaktionskammer zu bewegen;

(c) Aufheizen des Probenfluids in der Reaktionskammer, um die doppelsträngige DNA in eine einzelsträngige DNA zu trennen;

(d) Abkühlen der Probe, um eine Hybridisierung der Primermoleküle zu entgegengesetzten Strängen der einzelsträngigen DNA und eine Replikation der einzelsträngigen DNA durch die DNA-Polymerase zu ermöglichen; und

(e) Wiederholen der Schritte (c) und (d), um den gewünschten Grad an Vermehrung zu erzielen.

Bevorzugte Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung werden nachfolgend bezugnehmend auf die beiliegenden Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine perspektivische schematische Ansicht eines Ausführungsbeispiels eines Mikroreaktors der Erfindung;

Fig. 2 eine perspektivische schematische Ansicht eines zweiten Ausführungsbeispiels eines Mikroreaktors der Erfindung;

Fig. 3 eine perspektivische schematische Ansicht eines weiteren Ausführungsbeispiels eines Mikroreaktors der Erfindung;

Fig. 4 eine perspektivische schematische Ansicht einer Mikroreaktorvorrichtung der Erfindung, die sowohl einen Trennungsmikrokanal als auch ein auf der Vorrichtung befindliches bzw. Auf-Vorrichtung-(on-device) Reservoir aufweist;

Fig. 5 eine Draufsicht eines Mikroreaktors mit einer "Auf-Vorrichtung"-Reaktionskammer, die durch die Ausrichtung einer Reservoiranordnung gebildet wird, die auf zwei gegenüberliegenden planaren Oberflächen eines einzelnen flexiblen Substrats gebildet ist;

Fig. 6 eine Draufsicht einer Außenoberfläche eines Mikroreaktors, bei dem eine optionale bzw. wahlweise Betätigungseinrichtung über einer "Auf-Vorrichtung"-Reaktionskammer angeordnet ist;

Fig. 7 eine bildliche Darstellung des Mikroreaktors von Fig. 6;

Fig. 8 eine Querschnittsansicht des Betätigers, der in Fig. 6 gezeigt ist, entlang den Linien V-V und eine optionale Membran, die zwischen der Reaktionskammer und der Betätigungseinrichtung angeordnet ist;

Fig. 9 eine Photographie eines 2%-NuSieve-Agarosegels, das unter Verwendung von SyberGreenI® und UV-Licht sichtbar wurde, wobei diese Photographie die Vermehrung eines Teilfragments eines 308-bp-Vermehrungsproduktes veranschaulicht, wie es bei Beispielen 1-8 beschrieben wird.

Bevor die Erfindung detailliert beschrieben wird, wird darauf hingewiesen, daß, so lange nichts anderes angezeigt wird, diese Erfindung nicht auf spezielle Materialien, Komponenten oder Herstellungsprozesse beschränkt ist, die als solche variieren können. Es wird darauf hingewiesen, daß die Terminologie, die hierin verwendet wird, lediglich zu Zwecken der Beschreibung spezieller Ausführungsbeispiele besteht, und daß dieselbe nicht begrenzend wirken soll. Es muß darauf hingewiesen werden, daß die Singularformen "einer", "eine", "ein", "der", "die" und "das" wie sie in der Beschreibung und in den beiliegenden Ansprüchen verwendet werden, auch Pluralbezüge umfassen, so lange der Zusammenhang nicht deutlich etwas anderes anzeigt. Folglich umfaßt die Bezugnahme auf "ein Material" beispielsweise Mischungen aus Materialien, eine Bezugnahme auf "eine Reaktionskammer" mehrere Reaktionskammern und dergleichen.

In dieser Beschreibung und in den Ansprüchen, die folgen, wird auf eine Anzahl von Ausdrücken Bezug genommen, die definiert sein sollen, um die folgenden Bedeutungen zu haben:

Der Ausdruck "Mikroreaktor" bezieht sich auf eine Vorrichtung mit Merkmalen mit Mikrometer- oder Submikrometerabmessungen, die bei einer Vielzahl von chemischen Prozessen verwendet werden kann, die sehr kleine Mengen von Fluid umfassen (d. h. "Mikromengen" von Fluid in dem Bereich von etwa 1 µl bis 500 µl und vorzugsweise in dem Bereich von etwa 10 µl bis 200 µl). Der Prozeß von hauptsächlichem Interesse ist die Vermehrung von DNA unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion. Wahlweise kann die DNA-Vermehrung bzw. Verstärkung (DNA amplification) zusammen mit einer oder mehreren anderen Typen von Prozeduren durchgeführt werden. Solche Prozeduren umfassen ohne auf dieselben beschränkt zu sein: Präparationstechniken, die vor der PCR durchgeführt werden; eine Analyse und eine Trennung unter Verwendung von beispielsweise der Elektrophorese (z. B. CE oder MCE) oder der Chromatographie (z. B. µLC); und Post- bzw. Nach-Reaktionsreinigungsprozesse. Die Merkmale der Mikroreaktoren sind an spezielle Verwendungen angepaßt. Mikroreaktoren beispielsweise, die nicht nur bei der PCR-Vermehrung von DNA sondern fer-

ner bei Trennungsprozessen, wie z. B. der MCE, verwendet werden, enthalten Mikrokanäle (die hierin bei der Offenbarung als "Mikrosäulen" bezeichnet werden, d. h. wenn sich die Abdeckplatte an Ort und Stelle auf der Mikrokanalenthaltenden Substratoberfläche befindet) mit einem Durchmesser von der Größenordnung von 1 µm bis 200 µm und typischerweise von 10 µm bis 75 µm und mit einer Länge von etwa 0,1 bis 50 cm. Mikroreaktoren, die lediglich bei einer DNA-Vermehrung verwendet werden, werden Reaktionszonen (die hierin bei der Offenbarung als "Reaktionskammern" bezeichnet werden, d. h. wiederum dann, wenn sich die Abdeckplatte an Ort und Stelle auf der Mikrokanalenthaltenden Substratoberfläche befindet) mit einem Volumen von etwa 1 µl bis etwa 500 µl und typischerweise von etwa 10 µl bis 200 µl enthalten.

Der Ausdruck "Erfassungseinrichtung", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf jegliche Einrichtung, Struktur oder Konfiguration, die es ermöglicht, eine Probe in einer Mikroanalysevorrichtung der Erfindung unter Verwendung analytischer Erfassungstechniken, die in der Technik wohlbekannt sind, zu untersuchen bzw. abzufragen. Folglich kann eine Erfassungseinrichtung eine oder mehrere Öffnungen umfassen, die mit beispielsweise einer Reaktionskammer oder einem Mikrokanal kommunikativ verbunden sind, und die es einer externen Erfassungsvorrichtung ermöglichen, mit der Kammer oder dem Mikrokanal schnittstellenmäßig verbunden zu sein, um einen Analysestoff in derselben bzw. in demselben zu erfassen. Durch die Anordnung zweier Erfassungseinrichtungen, die sich einander relativ zu der Reaktionskammer oder dergleichen gegenüberliegen, wird ein "Erfassungsweg" gebildet, der die Erfassung von Analysestoffen, die durch die Reaktionskammer fließen, unter Verwendung von Erfassungstechniken ermöglicht, die in der Technik wohlbekannt sind. Ein "optischer Erfassungsweg" bezieht sich auf eine Konfiguration oder Anordnung einer Erfassungseinrichtung, um einen Weg zu bilden, wodurch eine elektromagnetische Strahlung in der Lage ist, von einer externen Quelle zu einer Einrichtung zum Empfangen von Strahlung zu gelangen, wobei die Strahlung die Reaktionskammer, den Mikrokanal oder dergleichen durchquert. Bei dieser Konfiguration können Analysestoffe, die durch den Mikroreaktor fließen, über die Transmission der Strahlung senkrecht zu der Fluidflußrichtung erfaßt werden. Eine Vielzahl von Techniken für eine externe optische Erfassung können ohne weiteres mit den vorliegenden Mikroreaktoren schnittstellenmäßig verbunden werden, einschließlich, aber nicht auf diese begrenzt, der UV/Vis- (Vis = visuell = sichtbar), Nah-IR-, Fluoreszenz-, Brechungsindex- (RI; RI = refractive index) und Raman-Technik.

Eine "transparente Substanz", wie sie hierin verwendet wird, bezieht sich auf eine Substanz, die in der Lage ist, Licht unterschiedlicher Wellenlängen durchzulassen. Folglich ist eine "transparente Lage" als eine Lage einer Substanz definiert, die für spezifische Typen einer interessierenden Strahlung oder interessierenden Teilchen durchlässig ist. Die transparenten Lagen, die in dem Zusammenhang mit der Erfindung verwendet werden können, werden aus Materialien, wie z. B. Quarz, Saphir, Diamant und Quarzglas, oder aus Polymermaterialien, wie z. B. Polystyren und Styrenbutadiencopolymer, gebildet. "Optisch transparent" bezieht sich auf ein Material, das in der Lage ist, Licht mit Wellenlängen in dem Bereich von etwa 150 nm bis 800 nm durchzulassen.

Ein "Erfassungsschnittpunkt" bezieht sich auf eine Konfiguration, bei der eine Mehrzahl von Erfassungseinrichtungen, die mit dem Inneren der vorliegenden Mikroreaktoren kommunikativ verbunden sind, an einer speziellen Position in denselben zusammen angeordnet sind. Eine Anzahl von Erfassungstechniken können an einer Probe oder an einem getrennten Analysestoff an dem Erfassungsschnittpunkt gleichzeitig durchgeführt werden. Ein Erfassungsschnittpunkt wird gebildet, wenn sich eine Mehrzahl von Erfassungswegen kreuzt, oder wenn eine Erfassungseinrichtung, wie z. B. eine Apertur bzw. Öffnung, mit dem Trennungsabteil an im wesentlichen dem selben Punkt wie ein Erfassungsweg kommunikativ verbunden ist. Die Probe oder ein getrennter Analysestoff können auf diese Weise unter Verwendung einer Kombination aus UV/Vis- und Fluoreszenz-Techniken, optischen und elektrochemischen Techniken, optischen und elektrischen Techniken und derartigen Kombinationen analysiert werden, um hochempfindliche Erfassungsinformationen zu liefern. Siehe beispielsweise Beckers et al. (1988) J. Chromatogr. 452: 591-600 und U.S.-Patent Nr. 4,927,265, erteilt an Brownlee.

Der Ausdruck "Flüssigphasenanalyse" wird verwendet, um sich auf jegliche Analyse zu beziehen, die an einem gelösten Stoff in der flüssigen Phase ausgeführt wird. Dementsprechend umfaßt die "Flüssigphasenanalyse", wie sie hierin verwendet wird, chromatographische Trennungen, elektrophoretische Trennungen und elektrochromatographische Trennungen. Der allgemeine Ausdruck "Analyse" bezieht sich auf eine Charakterisierung einer Probe oder eine Identifikation einer oder mehrerer Komponenten in derselben und unterscheidet sich von einem chemischen oder biochemischen "Prozeß", bei dem ein Material chemisch oder biochemisch verändert wird, um ein gewünschtes Produkt zu erzeugen. Die DNA-Vermehrung unter Verwendung der PCR-Technik stellt hierin einen "Prozeß" dar, obwohl die PCR-Reaktion auch in Verbindung mit einem analytischen Prozeß durchgeführt werden kann (bei dem beispielsweise die Reaktion überwacht wird, oder wenn das Reaktionsprodukt analysiert wird, bevor dasselbe aus der Vorrichtung entfernt wird).

"Chromatographische" Prozesse umfassen allgemein Vorzugstrennungen von Komponenten, und umfassen Verfahren mit Umkehrphase, eine hydrophobische Wechselwirkung, einen Ionenaustausch, die Molekularsiebchromatographie und dergleichen.

"Elektrophoretische" Trennungen beziehen sich auf die Wanderung von Teilchen oder Makromolekülen mit einer elektrischen Nettoladung, wobei die Wanderung durch ein elektrisches Feld beeinflusst wird. Dementsprechend umfassen elektrophoretische Trennungen Trennungen, die in Säulen durchgeführt werden, die mit Gelen (wie z. B. Polyacrylamid, Agarose und Kombinationen derselben) gepackt sind, sowie Trennungen, die in Lösung durchgeführt werden.

"Elektrochromatographische" Trennungen beziehen sich auf Trennungen, die unter Verwendung einer Kombination aus elektrophoretischen und chromatographischen Techniken bewirkt werden. Exemplarische elektrochromatographische Trennungen umfassen Gepackte-Säule-Trennungen unter Verwendung einer elektromotorischen Kraft (Knox et al. (1987) Chromatographia 24: 135; Knox et al. (1989) J. Liq. Chromatogr. 12: 2435; Knox et al. (1991) Chromatographia 32: 317), und Mizellare elektrophoretische Trennungen (Terabe et al. (1985) Anal. Chem. 57: 834-841).

Der Ausdruck "Spritzgießen" wird verwendet, um sich auf einen Prozeß zum Formen von Kunststoff- oder Nicht-Kunststoff-Keramik-Formen durch Einbringen einer abgemessenen Länge eines geschmolzenen Kunststoff- oder Keramiksubstrates in Formen (oder Gußformen) zu beziehen. Bei einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung können miniaturisierte Vorrichtungen unter Verwendung des Spritzgießens hergestellt werden.

Der Ausdruck "Prägen" wird verwendet, um sich auf einen Prozeß zum Bilden von Polymer-, Metall- oder Keramik-Formen zu beziehen, indem eine Prägeform in Kontakt mit einem bereits existierenden Werkstück aus Polymer, Metall oder Keramik gebracht wird. Eine gesteuerte Kraft wird zwischen der Prägeform und dem bereits existierenden Materialwerkstück derart angelegt, daß die Struktur und Form, die durch die Prägeform bestimmt wird, in das bereits existierende Werkstück aus Polymer, Metall oder Keramik gedrückt wird. Der Ausdruck "Heißprägen" wird verwendet, um sich auf einen Prozeß zum Bilden von Polymer-, Metall- oder Keramikformen zu beziehen, indem eine Prägeform in Kontakt mit einem erhitzten bereits existierenden Werkstück aus Polymer, Metall oder Keramik gebracht wird. Das bereits existierende Materialwerkstück wird derart erhitzt, daß dasselbe mit der Prägeform konform ist, wenn eine gesteuerte Kraft zwischen der Prägeform und dem bereits existierenden Werkstück angelegt wird. Die sich ergebende Polymer-, Metall- oder Keramikform wird abgekühlt und daraufhin von der Prägeform entfernt.

Der Ausdruck "LIGA-Prozeß" wird verwendet, um sich auf einen Prozeß zum Herstellen von Mikrostrukturen mit großen Längenverhältnissen und einer erhöhten strukturellen-Präzision unter Verwendung der Synchrotronstrahlungslithographie, der Galvanobildung und dem Kunststoffformen zu beziehen. Bei einem LIGA-Prozeß werden strahlungsempfindliche Kunststoffe lithographisch mit einer hochenergetischen Strahlung unter Verwendung einer Synchrotronquelle bestrahlt, um gewünschte Mikrostrukturen (wie z. B. Kanäle, Tore, Öffnungen bzw. Aperturen und Mikroausrichtungseinrichtungen) zu erzeugen, wodurch eine Primerschablone gebildet wird.

Der Ausdruck "Antriebskraft" bzw. "motorische Kraft" wird verwendet, um sich auf jegliche Einrichtung zum Bewirken einer Bewegung einer Probe entlang eines Flußweges in einem Mikroreaktor zu beziehen und umfaßt das Anlegen eines elektrischen Potentials über jeglichen Abschnitt eines Mikroreaktors, das Anlegen einer Druckdifferenz über jeglichen Abschnitt des Mikroreaktors oder eine Kombination derselben.

Die Ausdrücke "optionaler", "optionale", "optionales" oder "optional", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, daß das anschließend beschriebene Merkmal oder die anschließend beschriebene Struktur vorhanden sein kann oder auch nicht, oder daß das anschließend beschriebene Ereignis oder der anschließend beschriebene Umstand auftreten kann oder nicht, und daß die Beschreibung Beispielsfälle umfaßt, bei denen ein spezielles Merkmal oder eine spezielle Struktur vorhanden ist, und Fälle umfaßt, bei denen das Merkmal oder die Struktur nicht vorhanden ist, oder Fälle, bei denen das Ereignis oder der Umstand auftritt, und Fälle, bei denen dies nicht der Fall ist.

Ein Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist in Fig. 1 dargestellt, die schematisch einen Mikroreaktor darstellt, der beim Durchführen eines chemischen Prozesses, wie z. B. einer PCR, verwendet werden kann. Die Vorrichtung ist allgemein durch 11 dargestellt und umfaßt ein Substrat 13 mit einer im wesentlichen planaren Oberfläche 15, die eine Reaktionszone 17 in der Form eines flachen Hohlraumes, d. h. eines Hohlraumes mit einer Tiefe mit Mikrometer- oder sogar Submikrometerabmessungen, enthält. Eine Abdeckplatte 21 ist derart gezeigt, daß dieselbe über dem Substrat 13 angeordnet ist. Vor der Verwendung der Vorrichtung wird die Unterseite 25 der Abdeckplatte mit der Oberfläche 15 des Substrats 13 ausgerichtet und gegen dieselbe plaziert. Die Abdeckplatte bildet in Kombination mit der Reaktionszone 17 eine Reaktionskammer, in der der gewünschte chemische Prozeß ausgeführt wird. Ein Fluid, wie z. B. eine zu analysierende Probe, analytische Reagenzien, Reaktionsstoffe oder dergleichen, wird von einer externen Quelle durch das Einlaßtor 27 in die Reaktionskammer eingebracht; ein Auslaßtor 29 ermöglicht den Durchtritt eines Fluides von der Reaktionskammer zu einem externen Aufnahmebehälter. Dementsprechend ergibt das "Schließen" der Vorrichtung durch Ausrichtung der Abdeckung mit dem Substrat und das Bilden einer Abdichtung zwischen denselben die Bildung einer Reaktionskammer, in die durch das Einlaßtor 27 Fluide eingebracht und durch das Auslaßtor 29 entfernt werden können. Eine flüssigkeitsdichte Abdichtung wird vorzugsweise unter Verwendung von Druckabdichtungstechniken, einer externen Einrichtung, um die Werkstücke zusammenzupressen (wie z. B. Klammern, Druckfedern oder einer zugeordneten Klemmvorrichtung) oder Haftmitteln aus Verbindungspolymeren, Keramiken und dergleichen, die in der Technik wohl bekannt sind, gebildet.

Bei einem verwandten Ausführungsbeispiel der Erfindung, wie es in Fig. 2 dargestellt ist, sind Flußwege in der Form von Mikrokanälen in dem Substrat an beiden Enden der Reaktionszone untergebracht. Dies bedeutet, daß eine Vorrichtung 31 ein Substrat 33 mit einer im wesentlichen planaren Oberfläche 35 aufweist, die eine Reaktionszone 37 wiederum in der Form eines flachen Hohlraums enthält. Ein stromaufwärtiger Mikrokanal 39 in der Substratoberfläche befindet sich in einer Fluidkommunikation mit der stromaufwärtigen Region der Reaktionszone 37, während sich ein stromabwärtiger Mikrokanal 41 in Fluidkommunikation mit der stromabwärtigen Region der Reaktionszone 38 befindet. Die Abdeckplatte 43 ist derart gezeigt, daß dieselbe mit ihrer Unterseite 45 der Substratoberfläche zugewandt über dem Substrat 33 angeordnet ist. Die Unterseite 45 der Abdeckplatte wird mit dem Substrat ausgerichtet und vor der Verwendung der Vorrichtung auf der Oberfläche 35 plaziert. Das Schließen der Vorrichtung auf diese Art und Weise, d. h. durch Ausrichten der Abdeckung mit dem Substrat und Bilden einer Abdichtung zwischen denselben, ergibt die Bildung einer Reaktionskammer, einer stromaufwärtigen Mikrosäule und einer stromabwärtigen Mikrosäule. Auf das Schließen der Vorrichtung hin ermöglicht ein Einlaßtor 47 in der Abdeckplatte das Einbringen eines Fluides von einer externen Quelle in die stromaufwärtige Mikrosäule, während ein Auslaßtor 49, welches sich ebenfalls in der Abdeckplatte befindet, die Entfernung des Fluides aus der stromabwärtigen Mikrosäule ermöglicht. Die stromaufwärtige Mikrosäule kann als eine Konzentrierungseinrichtung verwendet werden, um die Konzentration eines speziellen Analysestoffes oder einer chemischen Komponente vor der chemischen Prozeßverarbeitung in der Reaktionskammer zu erhöhen. Ferner können auf diese Weise ungewollte, möglicherweise störende Proben- und Reaktionskomponenten unter Verwendung der stromaufwärtigen Mikrosäule entfernt werden. Zusätzlich oder alternativ kann der stromaufwärtige Mikrokanal als ein Präparations- bzw. Vorbereitungs-Mikroreaktor für chemische oder biochemische Präparationsprozesse vor einer DNA-Vermehrung in der Reaktionskammer dienen. Solche Präparationsprozesse können eine Etikettierung bzw. Indizierung, eine Proteindigesterung und dergleichen umfassen. Die stromabwärtige Mikrosäule kann als eine Reinigungseinrichtung verwendet werden, um nach dem Abschluß einer chemischen Prozeßverarbeitung unerwünschte Komponenten, nicht reagierte bzw. unreaktive Materialien usw. zu entfernen. Dies kann beispielsweise durch Packen der stromabwärtigen Mikrosäule oder Bedecken ihrer Innenoberfläche mit einem Material, das bestimmte Typen von Komponenten aus einem Fluid oder einer Reaktionsmischung selektiv entfernt, durchgeführt werden.

Es wird darauf hingewiesen, daß ein Mikroreaktor der Erfindung hergestellt werden kann, um zwei oder mehr Reaktionszonen und optionale Mikrokanäle, die sich in Fluidkommunikation mit dem bzw. denselben befinden, zu enthalten. Ein Beispiel einer solchen Vorrichtung ist in Fig. 3 dargestellt, wobei dieselbe allgemein mit 51 gezeigt ist und ein Substrat 53 und eine Abdeckplatte 55, die mit demselben ausgerichtet ist, aufweist. Die obere Oberfläche 57 des Substrats, eine im wesentlichen planare Oberfläche, ist mit einer ersten Reaktionszone 59 und einer zweiten Reaktionszone 61 versehen. Ein erster stromaufwärtiger Mikrokanal 63 befindet sich in Fluidkommunikation mit der stromaufwärtigen Region der ersten Reaktionszone 59, während sich ein zweiter stromaufwärtiger Mikrokanal 65 in Fluidkommunikation mit der stromaufwärtigen Region der zweiten Reaktionszone 61 befindet. Dementsprechend befindet sich ein erster stromabwärtiger Mikrokanal 67 in Fluidkommunikation mit der stromabwärtigen Region der ersten Reaktionszone 59, während sich ein zweiter stromabwärtiger Mikrokanal 69 in Fluidkommunikation mit der stromabwärtigen Region der zweiten Reaktionszone 61 befindet. Auf das Schließen der Vorrichtung durch Plazieren der Unterseite 71 der Abdeckplatte 55 auf der Substratoberfläche 57 hin werden aus der ersten und der zweiten Reaktionszone 59 und 61 zusammen mit zwei stromaufwärtigen Mikrosäulen (die aus dem ersten und dem zweiten stromaufwärtigen Mikrokanal 63 und 65 gebildet werden) und zwei stromabwärtigen Mikrosäulen (die aus dem ersten und dem zweiten stromabwärtigen Mikrokanal 67 und 69 gebildet werden) zwei Reaktionskammern gebildet. Ein erstes Einlaßtor 73 in der Abdeckplatte 55 ist mit dem stromaufwärtigen Ende des ersten stromaufwärtigen Mikrokanals 63 ausgerichtet, während ein zweites Einlaßtor 75 mit dem stromaufwärtigen Ende des zweiten stromaufwärtigen Mikrokanals ausgerichtet ist, wobei das erste und das zweite Einlaßtor 73 und 75 das Einbringen eines Fluids von einer externen Quelle in die erste bzw. zweite stromaufwärtige Mikrosäule liefern. Dementsprechend ist ein erstes Auslaßtor 77 in der Abdeckplatte 55 mit dem stromabwärtigen Ende des ersten stromabwärtigen Mikrokanals ausgerichtet, während ein zweites Auslaßtor 79 mit dem stromabwärtigen Ende des zweiten stromabwärtigen Mikrokanals ausgerichtet ist, wobei das erste und das zweite Auslaßtor 77 und 79 eine Entfernung des Fluids aus der ersten bzw. zweiten stromabwärtigen Mikrosäule liefern. Bei diesem Ausführungsbeispiel und bei den Ausführungsbeispielen von Fig. 1 und 2 können das Substrat und die Abdeckplatte an einer Kante verbunden sein, derart, daß das Schließen der Vorrichtung durch Falten der Abdeckplatte auf das Substrat bewirkt wird. Die Kante kann eine Falteinrichtung, wie z. B. eine Reihe von voneinander beabstandeten Perforierungen, Vertiefungen oder Öffnungen mit einer Form, wie z. B. einer kreisförmigen, rhombischen, hexagonalen, usw., umfassen, die das Falten und folglich die Gelenkbildung fördern.

Die Materialien, die verwendet werden, um die Substrate und Abdeckplatten bei den Mikroanalysevorrichtungen der Erfindung zu bilden, werden bezüglich physischer und chemischer Charakteristika ausgewählt, die für eine spezielle Anwendung wünschenswert sind. Auf alle Fälle muß das Substrat aus einem Material hergestellt werden, das die Bildung von hochdefinierten Merkmalen bzw. Merkmalen mit hoher Definiertheit (oder Merkmalen mit hoher "Auflösung"), d. h. Mikrokanälen, Kammern und dergleichen, die Mikrometer- oder Submikrometerabmessungen aufweisen, ermöglicht. Das heißt, daß das Material zu einer Mikroherstellung unter Verwendung von beispielsweise Trockenätzen, Naßätzen, Laserätzen, Formen, Prägen oder dergleichen in der Lage sein muß, um die gewünschten miniaturisierten Oberflächenmerkmale aufzuweisen; das Substrat ist vorzugsweise dazu in der Lage, auf eine derartige Art und Weise mikrohergestellt zu werden, um Merkmale in, auf und/oder durch die Oberfläche des Substrates zu bilden. Es können ferner Mikrostrukturen auf der Oberfläche eines Substrates durch Hinzufügen eines Materials auf demselben gebildet werden, wobei beispielsweise Polymerkanäle auf der Oberfläche eines Glassubstrates unter Verwendung eines photobelichtbaren Polyimids gebildet werden kann. Ferner sollten alle Vorrichtungsmaterialien, die verwendet werden, in Hinblick auf jegliche Reagenzien bzw. Reaktionspartner, mit denen dieselben in Kontakt kommen, unter den Reaktionsbedingungen, die verwendet werden, (z. B. bezüglich des pH-Wertes, der elektrischen Felder, usw.) chemisch inert und physisch stabil sein. Da die PCR relativ hohe Temperaturen mit sich bringt, ist es wichtig, daß alle Materialien in dem Bereich der verwendeten Temperaturen chemisch und physisch stabil sind. Für eine Verwendung mit einer optischen Erfassungseinrichtung sollten die Materialien, die verwendet werden, optisch transparent sein, und zwar typischerweise transparent für Wellenlängen in dem Bereich von etwa 150 nm bis 800 nm. Silizium, Siliziumdioxid und andere Silizium enthaltende Materialien sollten vermieden werden, wobei bevorzugte Materialien diejenigen sind, die gelöste Stoffe, wie z. B. Proteine oder andere Biomoleküle, nicht stark adsorbieren. Geeignete Materialien zum Bilden der vorliegenden Vorrichtung umfassen Polymermaterialien, Keramiken (einschließlich Aluminiumoxid und dergleichen), Glas, Metalle, Verbundstoffe und Lamine derselben, sind aber nicht darauf begrenzt.

Polymermaterialien sind hierin besonders bevorzugt und werden typischerweise organische Polymere sein, die entweder Homopolymere oder Copolymere, natürlich auftretend oder künstlich, vernetzt oder unvernetzt sind. Spezifische Polymere von Interesse umfassen Polyimide, Polycarbonate, Polyester, Polyamide, Polyether, Polyurethane, Polyfluorkarbonate, Polystyrene, Poly(Acrylonitril-Butadien-Styren) (ABS) Acrylat und Acrylsäurepolymere, wie z. B. Polymethylmethacrylat, und andere substituierte und unsubstituierte Polyolefine und Copolymere derselben, sind aber nicht darauf begrenzt. Polyimide sind von speziellem Interesse und haben sich als ein hochwünschenswertes Substratmaterial bei mehreren Kontexten bzw. Zusammenhängen erwiesen. Es hat sich beispielsweise gezeigt, daß Polyimide geringe Sorptionseigenschaften bezüglich Proteinen zeigen, von denen bekannt ist, daß dieselben bei herkömmlichen Siliziumdioxid-basierten Systemen besonders schwierig zu analysieren sind. Polyimide sind beispielsweise unter dem Markennamen Kapton® (DuPont, Wilmington DE) und Upilex® (Ube Industries, Ltd., Japan) kommerziell verfügbar.

Die Vorrichtungen der Erfindung können ferner aus einem "Verbundstoff" hergestellt werden, d. h. einer Zusammensetzung, die aus ungleichen Materialien besteht. Der Verbundstoff kann ein Blockverbundstoff, z. B. ein A-B-A-Blockverbundstoff, ein A-B-C-Blockverbundstoff oder dergleichen sein. Alternativ kann der Verbundstoff eine heterogene Kombination von Materialien, d. h. bei der sich die Materialien aus getrennten Phasen unterscheiden, oder eine homogene Kombination von ungleichen Materialien sein. Der Ausdruck "Verbundstoff", wie er hierin verwendet wird, wird verwendet, um einen "Laminat"-Verbundstoff zu umfassen. Ein "Laminat" bezieht sich auf ein Verbundstoffmaterial, das aus mehreren unterschiedlichen verbundenen Schichten eines identischen Materials oder unterschiedlicher Materialien gebildet ist. Weitere bevorzugte Verbundstoffsubstrate umfassen Polymerlamine, Polymer-Metall-Lamine, z. B. ein Polymer das mit Kupfer beschichtet ist, einen Keramik-in-Metall- oder einen Polymer-in-Metall-Verbundstoff. Ein be-

vorzugtes Verbundstoffmaterial ist ein Polyimidlaminat, das aus einer ersten Schicht aus Polyimid, wie z. B. Kapton®, das von DuPont (Wilmington, Delaware) verfügbar ist, gebildet ist, die zusammen mit einer zweiten dünnen Schicht einer Wärmehaftmittelform von Polyimid, die als KJ® bekannt ist und ebenfalls von DuPont (Wilmington, Delaware) verfügbar ist, extrudiert worden ist.

- Die Oberflächen der Substrate und Abdeckplatten können chemisch modifiziert sein, um wünschenswerte chemische oder physikalische Eigenschaften zu liefern, z. B. um die Adsorption von molekularen Anteilen an den Innenwänden eines Mikrokanals oder einer Reaktionskammer und den EOF zu reduzieren. Die Oberfläche eines Polymer- oder Keramik-Substrates kann beispielsweise mit einer elektrisch neutralen Molekularspezies, zwitterionischen Gruppen, hydrophilen oder hydrophobischen Oligomeren oder Polymeren, usw. bedeckt sein oder funktionalisiert sein, um dieselben zu enthalten. Mit Polyimiden, Polyamiden und Polyolefinen, die Reaktionsorte oder funktionelle Gruppen aufweisen, wie z. B. Carboxyl-, Hydroxyl-, Amino- und Haloalkyl-Gruppen (z. B. Polyvinylalkohol, Polyhydroxystyren, Polyacrylsäure, Polyacrylnitril, usw.), oder mit Polymeren, die modifiziert werden können, um solche Reaktionsorte oder funktionelle Gruppen zu enthalten, ist es möglich, Gruppen an der Oberfläche chemisch zu binden, die eine Vielzahl von wünschenswerten Oberflächeneigenschaften liefern können. Ein exemplarisch modifiziertes Substrat ist ein Polyimid-funktionalisiertes Substrat, um oberflächengebundene wasserlösliche Polymere, wie z. B. Polyethylenoxid (PEO), zu enthalten, was dazu tendiert, eine unerwünschte Adsorption zu reduzieren und eine nicht spezifische Bindung bei einer DNA-Vermehrung und anderen Verfahren, die Hybridisierungstechniken umfassen, zu minimieren. Die Substratoberfläche kann ferner vorteilhafterweise unter Verwendung von oberflächenaktiven Stoffen (z. B. Polyethylenoxidtriblockcopolymeren, wie z. B. diejenigen, die unter dem Markennamen "Pluronic" verfügbar sind, Polyoxyethylensorbitan oder "TWEEN"), natürlichen Polymeren (z. B. Bovinserumalbumin oder "BSA") oder anderen Anteilen, die die gewünschten Oberflächencharakteristika, insbesondere bei Reduzierung der Sorption von Biomolekülen, wie z. B. Proteinen, liefern, modifiziert werden.

- Es sollte ferner betont werden, daß unterschiedliche Regionen eines einzelnen Substrates chemisch unterschiedliche Oberflächen aufweisen können, so daß beispielsweise die Innenoberfläche eines Mikrokanals ein erstes Material aufweisen kann, während die Innenoberfläche einer Reaktionskammer, die sich in Fluidkommunikation mit diesem Mikrokanal befindet, ein zweites Material aufweisen kann. Die Reaktionskammer oder die Reaktionskammern können beispielsweise Innenoberflächen aufweisen, die mit beispielsweise PEO oder dergleichen bedeckt oder funktionalisiert sind, während die Innenoberflächen der Mikrokanäle, die den Reaktionskammern bzw. der Reaktionskammer zugeordnet sind, nicht bedeckt oder nicht funktionalisiert sein können. Ferner können stromaufwärtige und stromabwärtige Mikrokanäle hergestellt sein, um ein Ionenaustauschharz, eine Metalchelatebildungsverbindung, ein Affinitätsadsorbiermaterial oder dergleichen zu enthalten, d. h. Materialien, die ausgewählt sind, um ein Fluid oder eine Probe durch Entfernen einer oder mehrerer Komponenten oder Typen von Komponenten von derselben zu reinigen. Auf diese Weise können unterschiedliche Komponenten und Merkmale, die in dem selben Substrat vorhanden sind, verwendet werden, um unterschiedliche chemische oder biochemische Prozesse oder unterschiedliche Schritte in einem einzigen chemischen oder biochemischen Prozeß durchzuführen.

- Die vorliegenden Mikroreaktoren können unter Verwendung jeglichen geeigneten Verfahrens hergestellt werden, einschließlich, aber nicht darauf begrenzt, Mikroformungs- und Gußtechniken, Prägußverfahren, die Oberflächenmikrobearbeitung und Volumenmikrobearbeitung. Die letztgenannte Technik umfaßt die Bildung von Mikrostrukturen durch direktes Ätzen in ein Volumenmaterial, und zwar typischerweise unter Verwendung chemischen Naßätzens oder des Reaktionsionenätzens ("RIE"; RIE = reactive ion etching). Die Oberflächenmikrobearbeitung umfaßt die Herstellung von Filmen, die auf die Oberfläche eines Substrates aufgebracht werden. Ein exemplarischer Oberflächenmikrobearbeitungsprozeß ist als "LIGA" bekannt. Siehe hierzu beispielsweise Becker et al. (1986), "Fabrication of Microstructures with High Aspect Ratios and Great Structural Heights by Synchrotron Radiation Lithography, Galvanofarming, and Plastic Moulding (LIGA Process)", *Microelektronik Engineering* 4(1): 35-36, Ehrfeld et al. (1988), "1988 LIGA Process: Sensor Construction Techniques via x-Ray Lithography", *Tech. Digest from IEEE Solid-State Sensor and Actuator Workshop*, Hilton Head, SC; Gückel et al. (1991) *J. Micromech. Microeng.* 1: 135-138.

- LIGA umfaßt das Aufbringen einer relativ dicken Schicht eines Röntgenstrahlungsresists bzw. Schutzlackes auf einem Substrat gefolgt von einem Aussetzen desselben bezüglich einer hochenergetischen Röntgenstrahlung durch eine Röntgenmaske und das Entfernen der belichteten Resist-Abschnitte unter Verwendung eines chemischen Entwicklers. Das LIGA-Formstück, das auf diese Weise bereitgestellt wird, kann verwendet werden, um Strukturen mit horizontalen Abmessungen - d. h. Durchmessern - in der Größenordnung von Mikrometern zu präparieren.

- Eine bevorzugte Technik zum Präparieren der vorliegenden Mikroreaktoren ist die Laserablation. Bei der Laserablation werden kurze Pulse eines intensiven ultravioletten Lichtes in einer dünnen Oberflächenschicht eines Materials absorbiert. Bevorzugte Pulsenergien sind größer als etwa 100 Millijoule pro Quadratzentimeter, wobei die Pulsdauern kürzer als etwa 1 Mikrosekunde sind. Unter diesen Bedingungen hitzedissoziiert bzw. löst das intensive UV-Licht die chemischen Bindungen in der Substratoberfläche. Die absorbierte UV-Energie ist auf ein solch kleines Volumen des Materials konzentriert, daß dieselbe die dissoziierten Fragmente schnell aufheizt und dieselben von der Substratoberfläche weg herausschleudert. Da diese Prozesse so schnell auftreten, besteht keine Zeit für die Hitze, sich in das umliegende Material auszubreiten. Als ein Ergebnis wird die umliegende Region nicht geschmolzen oder auf andere Weise beschädigt, und der Rand der ablatierten Merkmale kann die Form des einfallenden optischen Strahls mit einer Präzision in der Größenordnung von etwa 1 Mikrometer oder weniger nachbilden. Die Laserablation wird typischerweise die Verwendung eines hochenergetischen Photonenlasers, wie z. B. eines Excimer-Lasers des F₂-, ArF-, KrCl, KrF oder XeCl-Typs, aufweisen. Andere UV-Lichtquellen mit im wesentlichen den selben optischen Wellenlängen und Energiedichten können jedoch ebenfalls verwendet werden. Die Laserablationstechniken werden beispielsweise von Znotins et al. (1987) *Lasen Focus Electro Optics*, auf Seite 54-70, und in den U.S.-Patenten Nr. 5,291,226 und 5,305,015, erteilt an Schantz et al., beschrieben.

Die Herstellungstechnik, die verwendet wird, muß Merkmale mit einer ausreichend hohen Definiertheit liefern, d. h. Mikrometerskalakomponenten, -kanäle, -kammern usw., derart, daß eine präzise Ausrichtung - "Mikroausrichtung" -

dieser Merkmale möglich ist. Die "Mikroausrichtung" bezieht sich auf die präzise und genaue Ausrichtung der laserablatierten Merkmale und umfaßt die Ausrichtung von komplementären Mikrokanälen oder Mikroabteilen zueinander, von Einlaß- und/oder Auslaßstoren zu Mikrosäulen oder Reaktionskammern, von Erfassungseinrichtungen zu Mikrosäulen oder Trennungsabteilen, von Erfassungseinrichtungen zu anderen Erfassungseinrichtungen, von Vorsprüngen und zusammenpassenden Vertiefungen, von Rillen und zusammenpassenden Leisten und dergleichen.

Ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung ist auf einen Mikroreaktor gerichtet, wie er in Fig. 4 gezeigt ist, der sowohl eine miniaturisierte Säule zum Durchführen von Trennungsprozessen, z. B. elektrophoretischen oder chromatographischen Trennungen, als auch ein Reservoirabteil aufweist, das als eine Reaktionskammer zum Ausführen einer oder mehrerer chemischer oder biochemischer Reaktionen dient. Die Vorrichtung ist allgemein mit 2 gezeigt und umfaßt ein ausgewähltes Substrat 4 mit einer ersten und einer zweiten im wesentlichen planaren Oberfläche, die sich gegenüber liegen und mit 6 bzw. 8 angezeigt sind, wobei dieselbe aus einem anderen Material als Silizium oder Siliziumdioxid hergestellt ist. Das Material ist vorzugsweise, wie wohl nicht notwendigerweise, UV-absorbierend und laserablatierbar. In einer ersten planaren Oberfläche 6 des Substrats 4 ist ein Mikrokanal 10 laserablatiert oder auf andere Weise gebildet. Es ist ohne weiteres erkennbar, daß, obwohl der Mikrokanal 10 in einer allgemein erstreckten Form dargestellt ist, die Mikrokanäle, die bei der Ausführung der Erfindung gebildet werden, eine Vielzahl von Konfigurationen aufweisen können, wie z. B. einen geradlinigen, serpentinenförmigen, spiralförmigen oder jeglichen kurvigen Weg, der erwünscht ist, und jegliche Anzahl von unterschiedlichen Querschnittformen aufweisen kann, d. h. jegliche einer breiten Vielzahl von Kanalgeometrien, einschließlich halbkreisförmig, rechteckig, rhombisch und dergleichen, und die Kanäle können in einem breiten Bereich von Längenverhältnissen gebildet sein. Zusätzlich können zwei oder mehr Mikrokanäle in einem einzigen Substrat vorhanden sein. Wie es in Fig. 4 angezeigt ist, weist der Mikrokanal 10 ein stromaufwärtiges Ende, das mit 12 angezeigt ist, und ein mit 14 angezeigte stromabwärtiges Ende auf.

Die erste planare Oberfläche 6 umfaßt ferner eine Auf-Vorrichtung-Reservoirereinrichtung 16, die aus einem Hohlraum gebildet ist, der in der ersten planaren Oberfläche 6 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt worden ist. Der Hohlraum kann in jeglicher Geometrie und mit einem beliebigen Längenverhältnis, die lediglich durch die Gesamtdicke des Substrats 4 beschränkt sind, gebildet sein, um eine Reservoirereinrichtung mit einem gewünschten Volumen zu liefern. Die Reservoirereinrichtung kann verwendet werden, um ein Ausgleichsflußfluid, eine Fluidregelungsfunktion oder Reagenzien zum Verbessern der Erfassung oder Trennung von Flüssigprobenbestandteilen zu liefern. Die Reservoirereinrichtung kann ferner als eine Reaktionszone dienen, in der chemische oder biochemische Prozesse durchgeführt werden sollen. Solche Prozesse umfassen, wie es bereits früher hierin angemerkt wurde, eine Trennung (z. B. eine chromatographische, elektrophoretische oder elektrochromatographische Trennung), Filterungs- und Diagnosevorgänge (unter Verwendung von beispielsweise einer Hybridisierung oder einer anderen Bindungseinrichtung) und eine chemische oder biochemische Synthese (z. B. DNA-Vermehrung, wie sie unter Verwendung der PCR ausgeführt werden kann), sind aber nicht darauf beschränkt. Die Reservoirereinrichtung 16 befindet sich in Fluidkommunikation mit dem Mikrokanal 10 über eine Fluidleitungseinrichtung 18, die aus einer Rohrleitung gebildet ist, die in der ersten planaren Oberfläche 6 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt ist.

Eine Abdeckplatte 20 ist über der ersten planaren Oberfläche 6 angeordnet und bildet in Verbindung mit dem Mikrokanal 10 eine längliche Trennungsmikrosäule. Ferner bildet die Abdeckplatte 20 in Kombination mit der Reservoirereinrichtung 16 bildet ein Reservoirabteil (oder es wird, wenn der Reservoirereinrichtung als eine Reaktionszone dient, eine "Reaktionskammer" auf das Plazieren der Abdeckplatte auf das Substrat hin gebildet werden) und auf ähnliche Weise in Kombination mit der Fluidleitungseinrichtung 18 ein Fluidleitungsabteil, das das Reservoirabteil mit der Trennungsmikrosäule kommunikativ verbindet. Die Abdeckplatte 20 kann über der ersten planaren Oberfläche 6 befestigbar ausgerichtet werden, um eine flüssigkeitsdichte Trennungsmikrosäule zu bilden, indem Druckabdichtungstechniken, eine externe Einrichtung, um die Werkstücke zusammen zu drücken (wie z. B. Klammern, Druckfedern oder zugeordnete Klemmvorrichtungen) oder Haftmittel aus Verbindungspolymeren, Keramiken und dergleichen, die in der Technik wohl bekannt sind, verwendet werden.

Bei einer speziellen Vorrichtungskonfiguration umfaßt die Abdeckplatte 20 eine getrennte Komponente mit einer im wesentlichen planaren Oberfläche, die in der Lage ist, mit der ersten planaren Oberfläche 6 des Substrats 4 eng schnittstellenmäßig verbunden zu sein. Bei einer bevorzugten Vorrichtung sind das Substrat und die Abdeckplatte jedoch in einem einzigen, flexiblen Substrat gebildet. Bezugnehmend auf Fig. 4 umfaßt das flexible Substrat einen ersten und einen zweiten Abschnitt, die dem Substrat 4 und der Abdeckplatte 20 entsprechen, wobei jeder Abschnitt eine im wesentlichen planare Innenoberfläche aufweist. Der erste und der zweite Abschnitt sind durch zumindest eine Falteinrichtung, die allgemein mit 26 angezeigt ist, getrennt, derart, daß die Abschnitte ohne weiteres gefaltet werden können, um aufeinander aufzuliegen. Die Falteinrichtung 26 kann eine Reihe von voneinander beabstandeten Perforierungen in dem flexiblen Substrat, eine Reihe von voneinander beabstandeten Schlitz-förmigen Vertiefungen oder Öffnungen, die sich lediglich teilweise durch das flexible Substrat, erstrecken, oder dergleichen umfassen. Die Perforierungen oder Vertiefungen können kreisförmige, rautenförmige, hexagonale oder andere Formen aufweisen, die eine Gelenk- bzw. Knickbildung entlang einer vorbestimmten geradlinigen Linie fördern.

Die Vorrichtung 2 von Fig. 4 kann durch Laserablatieren eines Mikrokanals 10, einer Reservoirereinrichtung 16 und einer Fluidleitungseinrichtung 18 in dem Substrat 4 gebildet werden. Eine Trennungsmikrosäule, ein Reservoirabteil und ein Fluidleitungsabteil werden dann vorgesehen, indem das flexible Substrat an der Falteinrichtung 26 derart gefaltet wird, daß der Abdeckplattenabschnitt 20 den Mikrokanal, das Reservoir und die Fluidleitungseinrichtung einschließt.

Bei jeder der im vorhergehenden beschriebenen Vorrichtungen kann die Abdeckplatte 20 ferner eine Vielzahl von Öffnungen oder anderen Merkmalen aufweisen, die in dieselbe laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt worden sind. Insbesondere kann eine erste Öffnung angeordnet sein, um mit dem Trennungsabteil (das durch die Kombination aus dem Mikrokanal 10 und der Abdeckplatte 20 gebildet wird) benachbart zu dem stromaufwärtigen Ende 12 des Mikrokanals 10 kommunikativ verbunden zu sein, um ein Einlaßtor 22 zu liefern. Das Einlaßtor ermöglicht den Durchtritt eines Fluids von einer externen Quelle in das Trennungsabteil, wenn die Abdeckplatte 20 über der ersten planaren Oberfläche 6 angeordnet ist. Eine zweite Öffnung kann auf ähnliche Weise angeordnet sein, um mit der Trennungsmikrosäule benach-

bart zu dem stromabwärtigen Ende 14 des Mikrokanals 10 kommunikativ verbunden zu sein, um ein Auslaßtor 24 zu bilden, das den Durchtritt eines Fluides von dem Trennungsabteil in einen externen Aufnahmebehälter ermöglicht. Dem entsprechend erstreckt sich ein Flußweg von einem stromaufwärtigen Ende der Trennungsmikrosäule und verläuft zu einem stromabwärtigen Ende derselben, wodurch eine Flüssigphasenanalyse von Proben ausgeführt werden kann, indem

5 Fluide von einer zugeordneten Quelle (nicht gezeigt) durch das Einlaßtor übertragen, die Fluide durch die Trennungsmikrosäule geleitet werden und ermöglicht wird, daß die Fluide das Trennungsabteil über das Auslaßtor verlassen.

Verschiedene Einrichtungen zum Anlegen einer Antriebskraft entlang der Länge der Trennungsmikrosäule, wie z. B. eine Druckdifferenz oder ein elektrisches Potential, können ohne weiteres bei jeder der im vorhergehenden beschriebenen Vorrichtungen mit der Säulenvorrichtung über das Einlaß- und Auslaßtor schnittstellenmäßig verbunden werden. Bei

10 der Elektrophorese wird ein Spannungsgradient über den Flußweg von dem Einlaßtor zu dem Auslaßtor angelegt, wodurch bewirkt wird, daß die Komponenten in dem fließenden Fluid mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten fließen, die proportional zu deren Ladungen und/oder Massen sind. Wie es für Fachleute auf dem Gebiet offensichtlich ist, kann eine geeignete Einrichtung verwendet werden, um einen Spannungsgradienten über den Flußweg anzulegen.

Bei der speziellen Vorrichtungskonfiguration von Fig. 4 ermöglicht die Fluidleitungseinrichtung 18 den Durchtritt eines Fluides von der Reservoirvorrichtung 16 in die Trennungsmikrosäule an einer Position, die im wesentlichen auf halbem

15 Weg zwischen dem stromaufwärtigen und dem stromabwärtigen Ende 12 und 14 des Mikrokanals 10 liegt. Es wird darauf hingewiesen, daß, obwohl die Fluidleitungseinrichtung 18 auf diese Art und Weise dargestellt worden ist, die Fluidleitungseinrichtung angeordnet sein kann, um mit dem Trennungsabteil an jeglicher Position zwischen oder an dem stromaufwärtigen und dem stromabwärtigen Ende desselben kommunikativ verbunden zu sein.

Indem eine Fluidkommunikation zwischen dem Fluidleitungsabteil und der Trennungsmikrosäule ermöglicht wird, kann während des Fluidflußverlaufes eine Anzahl von Trennungs- oder Erfassungsverbesserungsoperationen durchgeführt werden. Die Reservoirvorrichtung 16 kann beispielsweise verwendet werden, um ein flüssiges Reagenz oder einen Farbstoff, z. B. einen Fluoreszenzindikator, zu liefern, der in der Lage ist, mit dem Analysestoff zu reagieren, um beispielsweise die Erfassbarkeit desselben zu verbessern.

20 Die Reservoirvorrichtung 16 kann verwendet werden, um Reagenzien, wie z. B. organische Zusätze, oberflächenaktive Stoffe, ionische Wirkstoffe bzw. Agenzen, anorganische Wirkstoffe oder dergleichen, zu liefern, die der Trennungsmikrosäule durch einen Anfangsmischschritt hinzugefügt werden können. Der chemische oder biochemische Prozeß, der in der Reaktionskammer durchgeführt wird, kann mit einem Trennungsprozeß (der beispielsweise in einem stromaufwärtigen Mikrokanal ausgeführt wird, der sich in einer Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer befindet) oder einem Reinigungsprozeß (der beispielsweise in einem stromabwärtigen Mikrokanal ausgeführt wird, der sich in einer Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer befindet) vorgenommen werden, wobei in diesem Fall eine Anzahl von Reagenzien, die die Empfindlichkeit und die Auflösung beeinflussen, eingeleitet bzw. eingebracht werden können, einschließlich Puffern, Wirkstoffen, die die Lösungsionenstärke beeinflussen, Wirkstoffen, die die Dielektrizitätskonstante oder Viskosität verändern, und oberflächenaktiven Stoffen, und zwar entweder oberhalb oder unterhalb ihrer kritischen

35 Mizellkonzentration (CMC; CMC = critical micellar concentration). Oberflächenaktive Stoffe unterhalb der CMC können mit der Innenoberfläche der Trennungsmikrosäule assoziieren und folglich die Selektivität bzw. die Selektivwirkung eines Flüssigphasentrennungssystems verändern. Eine mizellare Bildung aufgrund der Verwendung von oberflächenaktiven Stoffen oberhalb der CMC kann als eine pseudogepackte Säulenphase bei einem Trennungsmechanismus dienen, der als mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC; MEKC = micellar electrokinetic capillary chromatography) bekannt ist. Geeignete oberflächenaktive Stoffe für die MEKC umfassen SDS und CTAB. Zusätzlich können chirale Selektoren (z. B. Cyclodextrin, Kronenether oder dergleichen) verwendet werden, um eine verbesserte Trennung von optisch aktiven Spezies zu bewirken.

Eine Anzahl von Puffertypen können von der Reservoirvorrichtung 16 geliefert werden, wie z. B. übliche organische Puffer (z. B. Acetat- oder Citratpuffer), anorganische Puffer (z. B. Phosphat- oder Boratpuffer) oder Good's-Puffer (z. B. MES, ACES, MOPS, CAPS, HEPES und dergleichen), aber nicht ausschließlich diese. Wirkstoffe, die die Lösungsionenstärke beeinflussen, wie z. B. neutrale Salze (z. B. NaCl, KCl oder LiCl), können alternativ von der Reservoirvorrichtung geliefert werden. Wirkstoffe können von dem Reservoir ferner geliefert werden, um die Dielektrizitätskonstante einer Lösung in dem Trennungsabteil zu beeinflussen. Geeignete Wirkstoffe umfassen übliche organische Lösungsmittel, wie z. B. MeOH, EtOH, CH₃CN und Isopropylalkohol, sind aber nicht darauf begrenzt. Ferner kann von der Reservoir-

50 einrichtung 16 eine Anzahl von Wirkstoffen geliefert werden, um die Viskosität der Lösung, die durch das Trennungsabteil fließt, zu verändern, wie z. B. Methylzellulose, Dextran, Polyacrylamid, Polyethylenglykol oder Polyvinylalkohol. Wirkstoffe, die auf diese Art und Weise verwendet werden können, um die Oberflächenbenetzbarkeit zu verändern, umfassen neutrale oberflächenaktive Stoffe (TWEEN, BRIJ oder Alkylglukoside), zwitterionische oberflächenaktive Stoffe (z. B. CHAPS oder CHAPSO) und veränderte oberflächenaktive Stoffe (SDS oder CTAB).

Die Reservoirvorrichtung 16 kann ferner verwendet werden, um eine Analyse zu optimieren, indem ein erhöhter Druck an die Trennungsmikrosäule angelegt wird, nachdem ein gelöster Stoff begonnen hat, sich zu trennen. Insbesondere kann die Reservoirvorrichtung verwendet werden, um ein bekanntes Volumen eines Puffers zu der Trennungsmikrosäule an einem Punkt zu liefern, nachdem eine Trennung begonnen hat, wodurch der Druck, der auf die flüssige Probe ausgeübt wird, erhöht wird.

60 Bei jeder der im vorhergehenden beschriebenen Vorrichtungen können optionale Einrichtungen zum Einbringen eines Fluides von einer externen Quelle in das Reservoirabteil vorgesehen sein. Immer noch bezugnehmend auf die Vorrichtung von Fig. 4 ist eine Fluidleitungseinrichtung 28, die eine Rohrleitung umfaßt, die in dem Substrat 4 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt ist, derart dargestellt, daß dieselbe ein erstes Ende 30 aufweist, das sich in Fluidkommunikation mit der Reservoirvorrichtung 16 befindet. Die Fluidleitungseinrichtung 28 weist ein zweites Ende 32 auf, das sich in Fluidkommunikation mit einer Düsenöffnung 34 befindet, die in der Abdeckplatte 20 gebildet ist. Die Düsenöffnung 34 kann beispielsweise eine Öffnung umfassen, die in die Abdeckplatte 20 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt worden ist. Alternativ kann die Düsenöffnung in der Abdeckplatte positioniert sein, um sich in einer direkten Fluidkommunikation mit dem Reservoirabteil zu befinden. Bei jeder der im vorhergehenden beschriebenen Konfigura-

tionen ermöglicht die Düsenöffnung 34 jedoch das schnittstellenmäßige Verbinden einer externen Fluidquelle mit dem Reservoirabteil, wodurch extern enthaltene Puffer, Reagenzien oder dergleichen Fluide in das Reservoirabteil für einen anschließenden Durchtritt in das Trennungsabteil eingebracht werden können. Die externe Fluidquelle kann mit der Düsenöffnung durch eine zugeordnete mechanische Ventileinrichtung schnittstellenmäßig verbunden sein, um eine umlenkbare Fluidverbindung zu liefern. Dieses Merkmal ermöglicht, daß eine Vielzahl von Einbringungsverfahren oder anderen Fluideinbringungseinrichtungen verwendet werden können, um Reagenzien oder eine Probe über die Düsenöffnung 34 in das Reservoirabteil einzubringen, einschließlich der Druckeinspritzung, der hydrodynamischen Einspritzung oder der elektrokinetischen Einspritzung. Die externe Ventil- und Einbringungseinrichtung kann mit der Düsenöffnung durch eine Muffenkopplung mit derselben kommunikativ verbunden sein; jegliches andere geeignete Verbindungsverfahren, das in der Technik bekannt ist, kann jedoch ebenfalls hierbei verwendet werden.

Es wird nun auf Fig. 5 Bezug genommen, in der eine Variation des im vorhergehenden erwähnten Mikroreaktors zeigt, und in der die Vorrichtung allgemein mit 52 angezeigt ist, die einen Tragekörper 54 mit einer ersten und einer zweiten Komponentenhälfte aufweist, die mit 56 bzw. 58 angezeigt sind. Die erste und die zweite Komponentenhälfte 56 und 58 weisen jeweils im wesentlichen planare Innenoberflächen auf, die mit 60 bzw. 62 angezeigt sind, und in denen Merkmale mit hoher Definiertheit laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt sein können. Insbesondere ist eine erste Mikrokanalstruktur 64 in der ersten planaren Innenoberfläche 60 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt, während eine zweite Mikrokanalstruktur 66 in der zweiten planaren Innenoberfläche 62 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt ist. Die erste und die zweite Mikrokanalstruktur in dem Tragekörper 54 sind zueinander spiegelbildlich gebildet. Auf ähnliche Art und Weise umfaßt die Säulenvorrichtung 52 eine erste und eine zweite Reservoirereinrichtung 68 und 70, die aus Hohlräumen gebildet sind, die in der ersten und der zweiten planaren Oberfläche 60 bzw. 62 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt sind, wobei die Hohlräume spiegelbildlich zueinander gebildet sind. Eine erste und eine zweite Fluidleitungseinrichtung, die mit 72 und 74 angezeigt sind, sind aus Rohrleitungen gebildet, die in der ersten und der zweiten planaren Oberfläche laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt sind, wobei die Rohrleitungen im wesentlichen spiegelbildlich zueinander gebildet sind. Wie es im vorhergehenden beschrieben wurde ermöglicht die Fluidleitungseinrichtung eine Fluidkommunikation zwischen der Reservoirereinrichtung und den Mikrokanälen.

Die Säulenvorrichtung 52 wird zusammengebaut, indem die erste und die zweite Komponentenhälfte 56 und 58 in einer flach aneinanderliegenden Anordnung ausgerichtet werden (wie z. B. durch Falten). Die erste und die zweite Komponentenhälfte werden unter Verwendung von Druckabdichtungstechniken, wie z. B. der Anwendung einer Spannkraft oder unter Verwendung von Haftmitteln, die in der Technik voll Flüssigphasentrennungsvorrichtungen wohl bekannt sind, in einer befestigbaren Ausrichtung zueinander gehalten, um flüssigkeitsdichte Trennungsmikrosäulen, Reservoirabteile und Fluidleitungsabteile zu bilden. Wie es im vorhergehenden beschrieben wurde, werden die erste und die zweite Komponentenhälfte 56 und 58 durch zumindest eine Falteinrichtung getrennt, die allgemein mit 76 angezeigt ist, derart, daß die Hälften gefaltet werden können, um aufeinander aufzuliegen. Bei besonders bevorzugten Vorrichtungen umfaßt die Falteinrichtung 76 eine Reihe von voneinander beabstandeten Perforierungen in dem Substrat oder voneinander beabstandeten Schlitz-förmigen Vertiefungen oder Öffnungen, die sich lediglich teilweise durch das Substrat erstrecken.

Die Vorrichtung 52 umfaßt ferner eine Einrichtung zum kommunikativen Verbinden zugeordneter externer Fluidbehältereinrichtungen (nicht gezeigt) mit der Trennungsmikrosäule (die durch die Ausrichtung der Mikrokanäle 64 und 66 gebildet ist), um eine Flüssigphasentrennungsvorrichtung zu liefern. Insbesondere kann eine Mehrzahl von Öffnungen in dem Tragekörper 54 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt sein, wobei sich die Öffnungen von zumindest einer Außenoberfläche des Tragekörpers aus erstrecken und mit zumindest einem Mikrokanal kommunikativ verbunden sind, wobei die Öffnungen den Durchtritt eines Fluides durch dieselben ermöglichen. Insbesondere kann ein Einlaßtor in der zweiten Komponentenhälfte 58 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt sein, um mit einem ersten Ende 78 des Mikrokanals 66 kommunikativ verbunden zu sein. Auf die selbe Art und Weise kann ein Auslaßtor in der zweiten Komponentenhälfte laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt sein, um mit einem zweiten Ende 80 des Mikrokanals 66 kommunikativ verbunden zu sein.

Dementsprechend erstreckt sich ein Flußweg von dem ersten Ende 78 des Mikrokanals 66 zu dem zweiten Ende 80 desselben. Der Flußweg wird durch Leiten von Fluiden von einer zugeordneten Quelle (nicht gezeigt) durch das Einlaßtor, Leiten der Fluide durch das Trennungsabteil, das durch die Ausrichtung der Mikrokanäle 64 und 66 gebildet ist, und Ermöglichen, daß die Fluide die Trennungsmikrosäule über das Auslaßtor verlassen, eingerichtet.

Optional kann das Fluid aus dem Reservoirabteil durch eine Antriebseinrichtung, wie z. B. einen Betätiger bzw. ein Stellglied oder dergleichen, entfernt werden. Bezugnehmend auf Fig. 6-8 ist der Mikroreaktor 52 derart dargestellt, daß derselbe eine optionale Betätigungseinrichtung 102 aufweist, die über dem Reservoirabteil angeordnet ist, das durch die Ausrichtung der ersten und der zweiten Reservoirereinrichtung 68 und 70 gebildet ist. Wie es am besten in der Querschnittsdarstellung von Fig. 8 ersichtlich ist, ist das Reservoirabteil optional mit einer dünnen Membran 104 abgedeckt, um eine Membrantypnpumpe zu bilden. Ein erstes passives Einwegmikroventil 106 ist optional in dem Fluidleitungsabteil integriert, das durch die Ausrichtung der ersten und der zweiten Fluidleitungseinrichtung 72 und 74 gebildet wird, um einen Rückfluß eines verdrängten Fluides in das Reservoirabteil zu verhindern, wobei ein zweites passives Einwegmikroventil 108 in einer Reservoirbefüllungseinrichtung optional integriert ist, um sicherzustellen, daß das Fluid, das aus dem Reservoirabteil verdrängt wird, zu der Trennungsmikrosäule fließt.

Immer noch bezugnehmend auf Fig. 8 ist ein optionaler Gas- oder Flüssigkeits-gefüllter Hohlraum 110 unmittelbar oberhalb der Membran 104 angeordnet. Die Betätigungseinrichtung 102 kann verwendet werden, um durch Durchbiegen der Membran 104 eine Fluidverdrängung von dem Reservoirabteil zu bewirken. Insbesondere kann die Betätigungseinrichtung 102 wirken, um die Membran 104 direkt durchzubiegen. Dementsprechend kann die Betätigungseinrichtung eine piezoelektrische, Kolben-, Solenoid- oder ein anderer Typ von Membrandurchbiegungsvorrichtung sein. Alternativ kann die Betätigungseinrichtung eine Heizeinrichtung sein, durch die die Temperatur in dem Hohlraum 110 geregelt wird. Die Heizeinrichtung kann eine Heizeinrichtung des Widerstandstyps oder ein beliebiger Typ einer geeigneten Heizeinrichtung, die in der Technik bekannt ist, sein. Auf eine Betätigung hin nimmt die Temperatur der Heizeinrichtung

zu, wodurch der Inhalt des Hohlraums 110 aufgeheizt wird, das Volumen desselben zunimmt, eine abwärts gerichtete Durchbiegung der Membran 104 erzeugt wird, und das Fluid an dem Ventil 106 vorbei aus dem Reservoirabteil in die Fluidleitungseinrichtung und in die Trennungsmikrosäule verdrängt wird.

- Alternativ kann sich die Heizeinrichtung 102 in einem thermischen Kontakt mit dem Reservoirabteil selbst befinden. Bei dieser Konfiguration nimmt, wenn die Heizeinrichtungstemperatur zunimmt, das Volumen des Fluids in dem Reservoirabteil zu, wodurch dasselbe aus dem Reservoirabteil in die Trennungsmikrosäule verdrängt wird.

- Weitere Beispiele für Pumpvorrichtungen, die in die vorliegenden Vorrichtungen aufgenommen werden können, umfassen diejenigen, die nach den Prinzipien des Ultraschallbewirkten Transports (Moroney et al. (1991) Proc MEM S'91, S. 277) oder des elektrohydrodynamisch bewirkten Transports (Richter et al. (1991) Proc MEM S'91, S. 271) arbeiten. Zusätzlich können chemische Ventile verwendet werden, die aus elektrisch getriebenen Polyelektrolytgel bestehen (Osada (1991) Adv. Materials 3: 107; Osada et. al (1992) Nature 355: 242).

- Die Verwendung von transparenten Materialien bei den vorliegenden Mikroreaktoren, d. h. für das Substrat und vorzugsweise die Abdeckplatte, ermöglicht die Verwendung der Brechungsindex- (RI-) Erfassung, um getrennte interessierende Analytestoffe, die durch die Trennungsmikrosäulen fließen, zu erfassen. Eine zugeordnete Laserdiode, die eine Strahlung mit einer Wellenlänge emittiert, bei der das Vorrichtungsmaterial "transparent" ist, ermöglicht beispielsweise einen Erfassungsaufbau, bei dem keine zusätzlichen Merkmale in den Vorrichtungen vorgesehen sein müssen.

- Eine optionale Erfassungseinrichtung kann bei jedem der vorliegenden Mikroreaktoren einbezogen werden. Insbesondere auf die Vorrichtung von Fig. 3 bezugnehmend können eine oder mehrere Erfassungseinrichtungen in dem Substrat 4 und/oder der Abdeckplatte 20 laserablatiert oder auf andere Weise hergestellt sein. Insbesondere wird die Erfassungseinrichtung im wesentlichen stromabwärts bezüglich des stromaufwärtigen Endes 12 der Mikrosäule 10 angeordnet sein, um die Erfassung einer oder mehrerer Komponenten, die in derselben enthalten sind, zu ermöglichen. Es kann beispielsweise eine Öffnung durch das Substrat 4 vorgesehen sein, um mit dem Trennungskanal 10 kommunikativ verbunden zu sein. Eine entsprechende Öffnung kann auf ähnliche Weise in der Abdeckplatte 20 gebildet sein und so angeordnet sein, daß sich dieselbe in einer koaxialen Ausrichtung zu der Erfassungsöffnung in dem Substrat befindet, wenn die Abdeckplatte an dem Substrat befestigt ist. Bei einem Trennungsprozeß können Elektroden mit der miniaturisierten Säulenvorrichtung über die betreffenden entsprechenden Öffnungen verbunden sein, um getrennte interessierende Analytestoffe, die durch das Trennungsabteil fließen, durch elektrochemische Erfassungstechniken zu erfassen. Bei einer speziellen Vorrichtungskonfiguration bilden die koaxial ausgerichteten Öffnungen einen optischen Erfassungsweg, der die optische Erfassung getrennter Analytestoffe, die durch die Trennungsmikrosäule fließen, über die Transmission einer Strahlung senkrecht zu der Hauptachse der Trennungsmikrosäule (und dementsprechend senkrecht zu der Richtung des elektroosmotischen Flusses bei einer elektrophoretischen Trennung) ermöglicht.

- Eine breite Vielzahl von zugeordneten optischen Erfassungsvorrichtungen können mit den miniaturisierten Säulen unter Verwendung der optionalen Erfassungseinrichtungen schnittstellenmäßig verbunden werden. Folglich kann die Erfassung von Analytestoffen in Proben, die durch das Trennungsabteil fließen, ohne weiteres unter Verwendung von UV/Vis-, Fluoreszenz-, Brechungsindex- (RI-), Raman- und dergleichen spektrophotometrischen Techniken ausgeführt werden.

- Ferner wird es ohne weiteres deutlich, daß die Verwendung einer optischen Erfassungseinrichtung mit Öffnungen, die in das Substrat oder die Abdeckplatte ablatiert (oder auf andere Weise hergestellt) sind, eine sehr gute Steuerung über die effektive optische Erfassungsweglänge liefert. Die resultierende Erfassungsweglänge ist im wesentlichen gleich der kombinierten Dicke des Substrats 4 und der Abdeckplatte 20.

- Wie es im vorhergehenden in der Beschreibungseinleitung erörtert wurde, ist die PCR eine wohlbekannte und allgemein verwendete Technik auf dem Gebiet der Bioanalyse und der Genomenforschung. Fachleute auf dem Gebiet werden erkennen, daß die Erörterung der PCR-Verfahren, die hier geliefert wird, lediglich veranschaulichend ist und nicht begrenzend sein soll. Eine DNA bzw. DNS (Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonucleinsäure) kann durch thermisches Hin- und Hersteuern einer speziell gebildeten flüssigen Reaktionsmischung gemäß einem Polymerase-Kettenreaktions- (PCR-) Protokoll vermehrt werden, das mehrere Inkubationen bei unterschiedlichen Temperaturen umfaßt. Die Reaktionsmischung besteht aus verschiedenen Komponenten, wie z. B. der DNA, die vermehrt werden soll (dem Ziel) und zumindest zwei Oligonucleotidprimern, die auf eine vorbestimmte Weise ausgewählt sind, um zu einem Abschnitt der Ziel-DNA komplementär zu sein. Die Reaktionsmischung umfaßt ferner verschiedene Puffer, Enzyme und Desoxyribonucleotridiphosphate, wie z. B. dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

- Die Reaktionsmischung kann ferner Deckwirkstoffe oder oberflächenaktive Stoffe umfassen, um einen Biobewuchs durch Modifizieren der Innenoberflächen des Mikroreaktors zu verhindern. Beispiele solcher Deckwirkstoffe umfassen Polyethylenoxidtriblockcopolymere, Polyethylenglykole (PEG) mit Molekulargewichten, die von etwa 200 bis etwa 8000 reichen, natürliche Polymere, wie z. B. Bovinserumalbumine (BSA) oder andere Anteile, die die gewünschten Oberflächencharakteristika liefern, insbesondere diejenigen, die die Sorption von Biomolekülen, wie z. B. Proteinen, reduzieren.

- Das Doppelstrang-DNA-Molekül wird unter Verwendung von Hitze in zwei komplementäre Einzelstränge denaturiert. Die Primere lagern sich dann zu den Strängen an, wobei die Nucleosidmonophosphatreste in Anwesenheit einer thermostabilen DNA-Polymerase mit den Primern verbunden werden, um ein Primererweiterungsprodukt zu erzeugen. Nach der Primererweiterung existieren doppelt so viele doppelsträngige DNA-Moleküle. Dieser Prozeß wird wiederholt, wobei sich die Menge der vorhandenen DNA jedesmal in etwa verdoppelt. Das Ergebnis ist eine exponentielle Zunahme der Konzentration der Ziel-DNA, was als "Vermehrung" bzw. "Verstärkung" ("Amplifikation") der Ziel-DNA bekannt ist. Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion wird vollständig in den U.S.-Patenten Nr. 4,683,202 und Nr. 4,683,195 beschrieben.

- Bei einem Ausführungsbeispiel der Erfindung wird eine Lösung mit einem Volumen in dem Bereich von etwa 1 µL bis 500 µL und vorzugsweise 10 µL bis 200 µL, die die zu vermehrende Probe und geeignete Puffer und Reagenzien enthält, über jegliches geeignete Verfahren in den Mikroreaktor eingebracht. Das Einbringen der Probe wird unter Verwendung jeglicher geeigneten Einrichtung, einschließlich der elektrokinetischen Einspritzung, der hydrodynamischen Einspritzung, der spontanen Fluidverdrängung und dergleichen, erzielt. Die spezielle verwendete Einrichtung wird vor allem von

der Konfiguration des Kanals sowie der Notwendigkeit, ein präzises Probenvolumen einzubringen, abhängen. Wenn beispielsweise die verwendete Mikrokanalkonfiguration einen zweiten Mikrokanal aufweist, der den ersten oder Haupt-Mikrokanal schneidet, umfaßt, kann der zweite Kanal mit der Probe befüllt werden, die durch Anlegen eines geeigneten elektrischen Feldes in den Hauptmikrokanal bewegt wird.

Sobald das Probenfluid in die Reaktionskammer geleitet worden ist, wird der Mikroreaktor einem Wärme-Hin-und-Her-Steuervorgang unterzogen. Der Thermo-Hin-und-Her-Steuervorgang wird im allgemeinen einen Denaturierungsschritt bei etwa 93°C bis etwa 95°C für etwa 5 bis 30 Sekunden, einen Entspannungsschritt bei etwa 50°C bis etwa 65°C für 2 bis 20 Sekunden und einen Polymerisationsschritt bei etwa 72°C für 5 bis 30 Sekunden umfassen. Die Probe wird im allgemeinen 30 oder mehr Zyklen ausgesetzt, um die gewünschte Vermehrung zu erzeugen. Der Wärme-Hin-und-Her-Steuervorgang kann durch jegliches geeignete und bequeme Verfahren erzielt werden. Kommerzielle Wärme-Hin-und-Her-Steuereinrichtungen, wie z. B. der RapidCycler® von Idaho Technologies und der GeneAmp 2400® von PE-Applied Biosystems, sind verfügbar, wobei ein Wärme-Hin-und-Her-Steuervorgang ferner unter Verwendung einer Peltierplatte oder einer anderen Heizblockvorrichtung durchgeführt werden kann. Solche Verfahren und Vorrichtungen sind für Fachleute auf dem Gebiet wohlbekannt. Alternativ ist ein Wärme-Hin-und-Her-Steuervorgang unter Verwendung einer Wolframlampe als eine Infrarotstrahlungsquelle und mit einer Abkühlung, die durch eine Silenoid-torgesteuerte Quelle mit komprimierter Luft bewirkt wird, ein geeignetes Verfahren.

Nachdem der Wärme-Hin-und-Her-Steuervorgang abgeschlossen ist, wird der Mikroreaktor auf eine Temperatur von etwa 4°C abgekühlt, wobei die vermehrte Probe für eine anschließende Analyse, Prozeßverarbeitung, Behandlung oder eine Untersuchung entfernt wird. Die Probe wird über das Auslaßtor entfernt und kann dann unter Verwendung jeglicher geeigneter Technik extrahiert werden.

Es wird darauf hingewiesen, daß, obwohl die vorhergehende Beschreibung die bevorzugten Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung veranschaulicht, der Mikroreaktor gemäß der Erfindung verwendet werden kann, um eine andere Nucleinsäurevermehrung und/oder andere Reaktionstechniken neben der PCR auszuführen. Das im vorhergehenden beschriebene Beispiel ist lediglich exemplarisch. Diese Techniken umfassen die Ligasekettenreaktion und die Reparaturkettenreaktion, wie sie in Abramson et al. (1993) Current Opinion in Biotechnology 4: 41-47 erörtert werden. Die Ligasekettenreaktion wird ferner in Barany (1991) PCR Methods and Applications 1: 5-16 erörtert. Andere Verfahren, für die die Erfindung verwendet werden kann, umfassen das 3SR-Verfahren, das in Fahy et al. (1991), PCR Methods and Applications 1: 25-33 offenbart wird und die Strangversetzungsuntersuchung (SDA; SDA = Strand Displacement Assay), die in Walker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 392-396 erörtert wird.

Alle diese zusätzlichen Techniken umfassen Reaktionsmischungen, die Denaturierungs-, Entspannungs- und Erweiterungsprozessen unterzogen werden. Dieselben unterscheiden sich hauptsächlich lediglich in den spezifischen Erweiterungsmechanismen, die bei dem Primererweiterungsprozeß verwendet werden, bei dem die angelagerten Oligonucleotide erweitert werden, um den Zielstrang nachzubilden bzw. zu replizieren. Die Reparaturkettenreaktion und die LCR umfassen einen sich wiederholenden Wärme-Hin-und-Her-Steuervorgang. Die 3SR- und SDA-Verfahren umfassen einen Anfangsdenaturierungsschritt, der durch eine isotherme Inkubation für die Entspannungs- und Streckungsprozesse gefolgt wird.

Weitere mögliche Anwendungen der im vorhergehenden beschriebenen Geräte können ferner die cDNA-Synthese vor der PCR, die Ligation und die Kinase der DNA und anschließende Enzymbehandlungen umfassen, bei denen Reagenzienzusätze während der Inkubationen oder des Wärme-Hin-und-Her-Steuervorganges erforderlich sein können. Folglich sind die Ausführungsbeispiele der Erfindung Gegenstand von Modifizierung, Variation und Änderung, ohne den korrekten Schutzbereich der beiliegenden Ansprüche zu verlassen. Dementsprechend sollen alle solche Änderungen, Modifizierungen und Variationen, die in den Schutzbereich der beiliegenden Ansprüche fallen, umfaßt sein. Alle Patentanmeldungen, Patente und andere Veröffentlichungen, die hierin genannt wurden, werden in ihrer Gesamtheit unter Bezugnahme aufgenommen.

Es wird darauf hingewiesen, daß, obwohl die Erfindung in dem Zusammenhang mit bevorzugten spezifischen Ausführungsbeispielen derselben beschrieben worden ist, die vorhergehende Beschreibung lediglich exemplarisch und nicht den Schutzbereich der Erfindung begrenzend sein soll. Andere Aspekte, Vorteile und Modifikationen innerhalb des Schutzbereiches der Erfindung werden für Fachleute auf dem Gebiet, das die Erfindung betrifft, offenbar sein.

Alle Patente, Patentanmeldungen und Veröffentlichungen, die hierin erwähnt werden, werden hiermit in ihrer Gesamtheit unter Bezugnahme aufgenommen.

Ein GeneAmp® EZ rTth RNA PCR Kit® und der GeneAmp® rTth DNA Polymerase & EZ Buffer Pack® (PE-Applied Biosystems) wurden bei einem Beispiel 1 verwendet, um ein 308-bp-DNA-Bruchstück bzw. Fragment unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung zu vermehren. Es wurde zunächst eine Master-Mischung aus den Reagenzien, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, präpariert. Alle Reagenzien ausgenommen von Wasser und PEG 8000 wurden von dem GeneAmp® EZ rTth RNA PCR Kit® und dem GeneAmp® rTth DNA Polymerase & EZ Buffer Pack® erhalten. Das PEG 8000 wurde von Sigma erhalten und war nucleasefrei.

10 µL der Master-Mischung wurde in eine 200-µm-Innendurchmesser-12-Zoll- (30-cm-) Kapton®-Polyimidkapillarenröhre aufgebracht, die von Microlumen erhalten wurde.

Die Probe wurde in die Kapillarenröhrenrohrleitung über eine Kapillarwirkung geladen, wobei die Enden der Kapillarröhre unter Verwendung eines schnell aushärtenden Epoxids abgedichtet wurden. Die Röhre wurde daraufhin in eine dünnwandige 0,2-mL-PCR-Röhre eingefügt, wobei die ganze Einheit in eine Thermo-Hin-und-Her-Steuereinrichtung Idaho Technology RapidCycler® plazierte wurde. Die Probe wurde unter Verwendung der folgenden Hin-und-Her-Steuersequenz einem Wärme-Hin-und-Her-Steuervorgang unterzogen.

1. 10 Minuten bei 94°C;
2. 30 Sekunden bei 94°C;
3. 15 Sekunden bei 61°C;
4. 30 Sekunden bei 72°C;
5. 10 Minuten bei 72°C; und

6. gespeichert bis zur Verwendung bei 4°C.

Schritte 2-4 wurden in 35 Zyklen wiederholt.

Das Produkt wurde entfernt und bei 4°C gespeichert. Ein aliquoter Teil von 3,5 µL des gespeicherten Produktes wurde in eine 0,5-mL-Phiale plziert, wobei 3,5 µL des 2x-Lastpuffers, das 2x SyberGreen I® (Molecular Probes) enthält, hinzugefügt wurde. Die Lösung wurde bei Dunkelheit 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur bebrütet bzw. inkubiert, wobei eine Vermehrung über Agarosegelelektrophorese unter Verwendung eines 2%-NuSieve-3 : 1-Agarose-Gels bei 4°C unter Verwendung von 70 V für 2 Stunden und 45 Minuten bestärkt wurde.

Tabelle 1

Master-Mischung-Reagenzien

Komponente	Volumen (µL)
Wasser	19,25
PEG 8000	3,75
5X-EZ-Puffer®	10,0
dGTP	1,5
dATP	1,5
dTTP	1,5
dCTP	1,5
rTth-DNA-Polymerase	2,0
Mn(OAc) ₂ -Lösung, 25 mM	5,0
Primer DM 151	1,5
Primer DM 152	1,5
pAW109-RNA	1,0

Das Verfahren, das bei Beispiel 1 verwendet wurde, wurde 7mal unter Verwendung der Polyimidkapillarenrohrleitung, die verschiedenen Verfahren der Behandlung unterzogen wurde, und einer 380-µm-Innendurchmesser-Polyethylenröhre wiederholt. Das Produkt, das bei Beispiel 1 erzeugt wurde, und jedes der Produkte, die unter Verwendung der vorbehandelten Kapillarrohrleitung und der Polyethylenrohrleitung erhalten wurden, wurde einer Agarosegelelektrophorese unter Verwendung eines 2%-NuSieve-3 : 1-Agarose-Gels bei 4°C unter Verwendung von 70 V für 2 Stunden und 45 Minuten unterzogen. Die Ergebnisse der Elektrophorese sind in Fig. 9 dargestellt. Eine Tabellenaufstellung der Beispiele, der Behandlungen und der Säulennummer in Fig. 9 sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2.

Beispielnummern, Behandlungen und Säulennummern von Fig. 9

Beispielnummer	Behandlungsverfahren	Säulennummer von Fig. 9
1	Keines	6
2	1 Stunde bei 95°C erhitzt	4
3	2,5 Stunden bei 95°C erhitzt	5
4	gekocht und erhitzt	7
5	gekocht bei EDTA* und erhitzt	8
6	gekocht	9
7	gekocht bei EDTA*	10
8	Polyethylen-Rohrleitung	11

*Ethyldiamintetraessigsäure

Das Verfahren, das in Beispiel 1 beschrieben ist, wurde verwendet, um unter Verwendung von Bovinseralbumin (BSA) in einer 1 mg/mL-Konzentration in der Master-Mischung anstelle des PEG 8000 DAN zu vermehren.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Durchführen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), mit

- einer Reaktionskammer, die durch zwei oder mehr Innenoberflächen definiert ist;
 einer Einrichtung (27; 47) zum Einbringen von PCR-Reaktionskomponenten in die Kammer;
 einer Einrichtung (29; 49) zum Entfernen des PCR-Reaktionsprodukts aus der Kammer; und
 einer Einrichtung zum Steuern der Temperatur der Reaktionskammer,
 wobei die Vorrichtung aus einem Material hergestellt ist, das unter den Bedingungen, bei denen eine PCR-Reaktion durchgeführt wird, thermisch, chemisch und mechanisch stabil ist, und wobei dieselbe eine Reaktionskammer verwendet, die angepaßt ist, um Fluid in dem Bereich von etwa 1 µl bis 500 µl zu enthalten. 5
2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, bei der die Reaktionskammer angepaßt ist, um Fluid in dem Bereich von etwa 10 µl bis 200 µl zu enthalten.
3. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 oder 2, bei der das Material ein Polymer ist. 10
4. Vorrichtung gemäß Anspruch 3, bei der das Material bei Temperaturen in dem Bereich von 37°C bis 94°C stabil ist.
5. Vorrichtung gemäß Anspruch 3 oder 4, bei der das Material eine Glasübergangstemperatur T_g von zumindest etwa 100°C aufweist.
6. Vorrichtung gemäß Anspruch 5, bei der das Material eine Glasübergangstemperatur T_g in dem Bereich von etwa 100°C bis 150°C aufweist. 15
7. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 6, bei der das Material aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Polyimiden, Polycarbonaten, Polyestern, Polyamiden, Polyethern, Polyurethanen, Polyfluorokarbonen, Polystyrenen, Poly(Acrylonitril-Butadien-Styren), Polymethylmethacrylat, Polyolefinen und Copolymeren derselben besteht. 20
8. Vorrichtung gemäß Anspruch 7, bei der das Material Polyimid ist.
9. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, bei der das Material derart ist, daß in demselben Merkmale mit hoher Definiertheit hergestellt werden können.
10. Vorrichtung gemäß Anspruch 9, bei der die Merkmale Mikrokanäle mit einem Durchmesser von etwa 1 µm bis 200 µm aufweisen. 25
11. Vorrichtung gemäß Anspruch 10, bei der die Merkmale Mikrokanäle mit einem Durchmesser von etwa 10 µm bis 75 µm aufweisen.
12. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, bei der die Substratoberfläche behandelt ist, um die thermische Stabilität, die chemische Stabilität und die Biobewuchtsresistenz zu erhöhen.
13. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, bei der die Oberflächenbehandlung die Bildung einer Polyethylenoxidschicht aufweist. 30
14. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, bei der die Oberflächenbehandlung die Bildung einer Schicht aus Bovinserrumalbumin aufweist.
15. Mikroreaktor (31) zum Vermehren von DNA unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), mit einem Substrat (33) mit einer ersten und einer zweiten im wesentlichen planaren Oberfläche, die sich gegenüber liegen, wobei das Substrat einen Hohlraum und zumindest einen Mikrokanal (39, 41) aufweist, die in der ersten planaren Oberfläche (35) gebildet sind, und wobei der Hohlraum als eine Reaktionszone (37) dient, die sich in einer Fluidkommunikation mit jedem Mikrokanal befindet; und 35
- einer Abdeckplatte (43), die über der ersten planaren Oberfläche (35) angeordnet ist, wobei die Abdeckplatte in Kombination mit dem Hohlraum eine Reaktionskammer und mit jedem Mikrokanal eine Mikrosäule definiert; und 40
- zumindest einem Einlaßtor (47) und zumindest einem Auslaßtor (49), die direkt oder indirekt mit der Reaktionskammer kommunikativ verbunden sind, wobei die Tore den Durchtritt eines Fluides von einer externen Quelle in und durch die Reaktionskammer ermöglichen, wodurch ein Fluidflußweg definiert wird;
- wobei das Substrat (33) und die Abdeckplatte (43) aus einem Material bestehen, das unter den Bedingungen, die zum Durchführen einer PCR-Vermehrung von DNA verwendet werden, stabil und resistent gegen Biobewuchs ist. 45
16. Mikroreaktor gemäß Anspruch 15, bei dem das Substratmaterial verglichen zu einem Substrat, das aus einem Silizium-enthaltenden Material gebildet ist, eine reduzierte Adsorption von gelösten Stoffen liefert.
17. Mikroreaktor gemäß Anspruch 15 oder 16, bei dem das Substratmaterial modifiziert sein kann, um den elektroosmotischen Fluß eines fließenden Fluids, das sich mit demselben in Kontakt befindet, zu verändern.
18. Mikroreaktor gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17, bei dem das Substratmaterial ein Polymer ist. 50
19. Mikroreaktor gemäß Anspruch 18, bei dem das Substratmaterial aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Polyimiden, Polycarbonaten, Polyestern, Polyamiden, Polyethern, Polyurethanen, Polyfluorokarbonen, Polystyrenen, Poly(Acrylonitril-Butadien-Styren), Polymethylmethacrylat, Polyolefinen und Copolymeren derselben besteht.
20. Mikroreaktor gemäß Anspruch 19, bei dem das Substrat (33) aus Polyimid besteht.
21. Mikroreaktor gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20, bei dem die Substratoberfläche behandelt ist, um die thermische Stabilität, die chemische Stabilität und die Biobewuchtsresistenz weiter zu erhöhen. 55
22. Mikroreaktor gemäß Anspruch 21, bei dem die Oberflächenbehandlung die Bildung einer Polyethylenoxidschicht aufweist.
23. Mikroreaktor gemäß Anspruch 21, bei dem die Oberflächenbehandlung die Bildung einer Schicht aus Bovinserrumalbumin aufweist. 60
24. Mikroreaktor gemäß einem der Ansprüche 15 bis 23, der ferner einen zusätzlichen Hohlraum aufweist, der in der ersten planaren Oberfläche (57) gebildet ist und in Kombination mit der Abdeckplatte eine zusätzliche Reaktionskammer zum Durchführen einer PCR-Vermehrung von DNA bildet.
25. Mikroreaktor gemäß einem der Ansprüche 15 bis 24, bei dem die Reaktionskammer eine stromaufwärtige Region, in der ein Fluid eingebracht wird, und eine stromabwärtige Region, aus der das Fluid austritt, aufweist, und bei dem der zumindest eine Mikrokanal (39, 41) einen stromaufwärtigen Mikrokanal (39), der sich in einer Fluidkommunikation mit der stromaufwärtigen Region der Reaktionskammer befindet, und einen stromabwärtigen Mikrokanal (41), der sich in einer Fluidkommunikation mit der stromabwärtigen Region der Reaktionskammer befindet, 65

aufweist.

26. Mikroreaktor gemäß Anspruch 25, bei dem der stromaufwärtige Mikrokanal (39) in Kombination mit der Abdeckplatte (43) eine stromaufwärtige Mikrosäule bildet, und der stromabwärtige Mikrokanal (41) in Kombination mit der Abdeckplatte (43) eine stromabwärtige Mikrosäule bildet.

27. Mikroreaktor gemäß einem der Ansprüche 15 bis 26, der ferner eine Antriebseinrichtung aufweist, um ein Fluid durch den Fluidflußweg zu bewegen.

28. Mikroreaktor gemäß Anspruch 27, bei der die Antriebseinrichtung eine Einrichtung zum Anlegen einer Spannungsdifferenz aufweist.

29. Mikroreaktor gemäß Anspruch 27, bei der die Antriebseinrichtung eine Einrichtung zum Anlegen einer Druckdifferenz aufweist.

30. Mikroreaktor gemäß einem der Ansprüche 16 bis 29, bei der die Reaktionskammer proportioniert ist, um etwa 1 µl bis 500 µl Fluid zu enthalten.

31. Mikroreaktor gemäß Anspruch 30, bei der die Reaktionskammer proportioniert ist, um etwa 10 µl bis 200 µl Fluid zu enthalten.

32. Mikroreaktor gemäß einem der Ansprüche 15 bis 31, bei dem der zumindest eine Mikrokanal (39, 41) einen Durchmesser von 1 µm bis 200 µm aufweist.

33. Mikroreaktor gemäß Anspruch 32, bei dem der zumindest eine Mikrokanal (39, 41) einen Durchmesser von etwa 10 µm bis 75 µm aufweist.

34. Verfahren zum Durchführen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um DNA in einer Probe zu vermehren, mit folgenden Schritten:

Erhitzen der Probe, um die doppelsträngige DNA in eine einzelsträngige DNA zu trennen;

Abkühlen der Probe, um eine Hybridisierung von Primeroligonucleotiden zu der einzelsträngigen DNA zu ermöglichen;

Replizieren der DNA unter Verwendung einer DNA-Polymerase; und

Wiederholen der im vorhergehenden erwähnten Schritte, um den gewünschten Grad an Vermehrung zu erzielen, wobei das Verfahren ferner folgenden Schritt aufweist:

Durchführen der PCR in einem Mikroreaktor, der aus einem Material besteht, das unter den Bedingungen, bei denen die PCR-Reaktion durchgeführt wird, thermisch, chemisch und mechanisch stabil ist, und der eine Reaktionskammer verwendet, die angepaßt ist, um etwa 1 µl bis 500 µl Fluid zu enthalten.

35. Verfahren gemäß Anspruch 34, bei dem die Reaktionskammer angepaßt ist, um Fluid in dem Bereich von etwa 10 µl bis 200 µl zu enthalten.

36. Verfahren gemäß Anspruch 34 oder 35, bei dem das Material ein Polymer ist.

37. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 36, bei dem das Material bei Temperaturen in dem Bereich von etwa 37°C bis 94°C stabil ist.

38. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 37, bei dem das Material eine Glasübergangstemperatur T_g von zumindest etwa 100°C aufweist.

39. Verfahren gemäß Anspruch 38, bei dem das Material eine Glasübergangstemperatur T_g in dem Bereich von etwa 100°C bis 150°C aufweist.

40. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 35 bis 39, bei dem das Material aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Polyimiden, Polycarbonaten, Polyestern, Polyamiden, Polyethern, Polyurethanen, Polyfluorokarbonen, Polystyrenen, Poly(Acrylonitril-Butadien-Styren), Polymethylmethacrylat, Polyolefinen und Copolymeren derselben besteht.

41. Verfahren gemäß Anspruch 40, bei dem Material Polyimid ist.

42. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 41, bei dem das Material derart ist, daß in demselben Merkmale mit hoher Definiertheit hergestellt werden können.

43. Verfahren gemäß Anspruch 42, bei dem die Merkmale Mikrokanäle mit einem Durchmesser von etwa 1 µm bis 200 µm aufweisen.

44. Verfahren gemäß Anspruch 43, bei dem die Merkmale Mikrokanäle mit einem Durchmesser von etwa 10 µm bis 75 µm aufweisen.

45. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 44, bei dem die Substratoberfläche behandelt ist, um die thermische Stabilität, die chemische Stabilität und die Biobewuchtsresistenz zu erhöhen.

46. Verfahren gemäß Anspruch 45, bei dem die Oberflächenbehandlung die Bildung einer Polyethylenoxidschicht aufweist.

47. Verfahren gemäß Anspruch 45, bei dem die Oberflächenbehandlung die Bildung einer Schicht aus Bovinsermalbomin aufweist.

48. Verfahren zum Vermehren der Menge eines interessierenden DNA-Moleküls, das in einem kleinen Volumen eines Probenfluids enthalten ist, unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion, wobei das Verfahren folgende Schritte aufweist:

(a) Einbringen von bis zu etwa 10 µl eines Probenfluids, das das interessierende DNA-Molekül in doppelsträngiger Form, ein erstes und ein zweites Primermolekül, das zu entgegengesetzten Strängen des DNA-Moleküls komplementär ist, eine thermostabile DNA-Polymerase, freie Desoxynucleosidtriphosphate und einen PCR-Puffer enthält, in einen Mikroreaktor, wobei der Mikroreaktor folgende Merkmale aufweist:

ein Substrat (33) mit einer ersten und einer zweiten im wesentlichen planaren Oberfläche, die sich gegenüber liegen, wobei das Substrat (33) einen Hohlraum aufweist, der in der ersten planaren Oberfläche gebildet ist, und wobei der Hohlraum als eine Reaktionszone (37) dient,

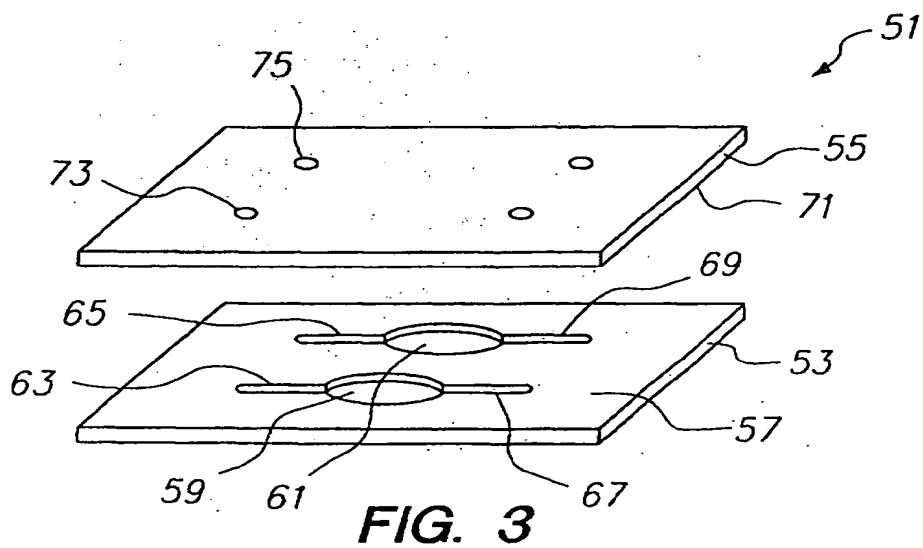
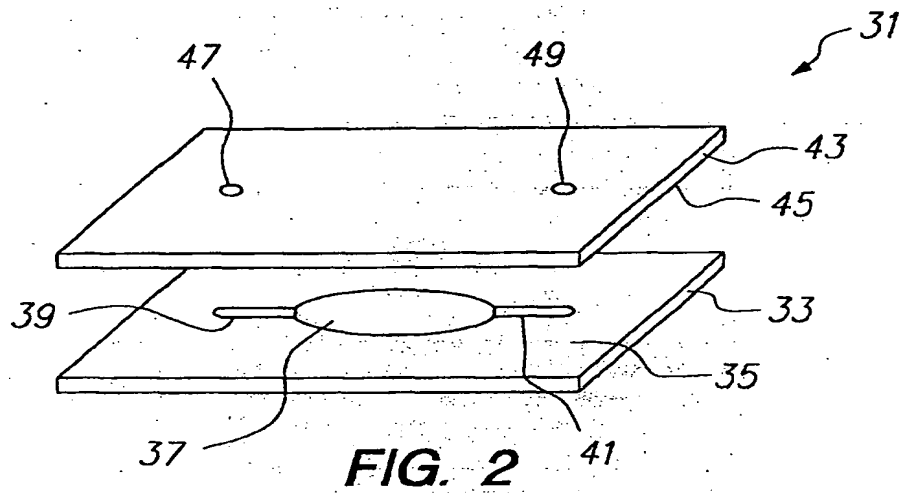
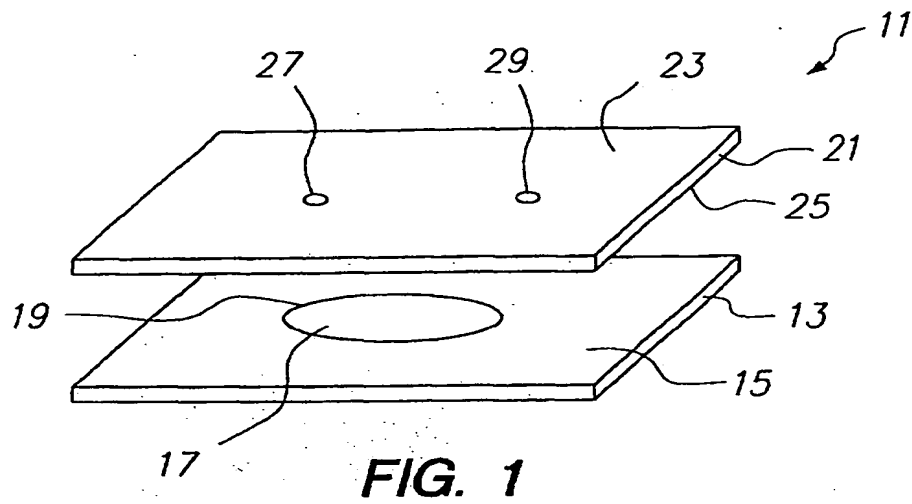
eine Abdeckplatte (43), die über der ersten planaren Oberfläche (35) angeordnet ist, wobei die Abdeckplatte (43) in Kombination mit dem Hohlraum eine Reaktionskammer definiert, und

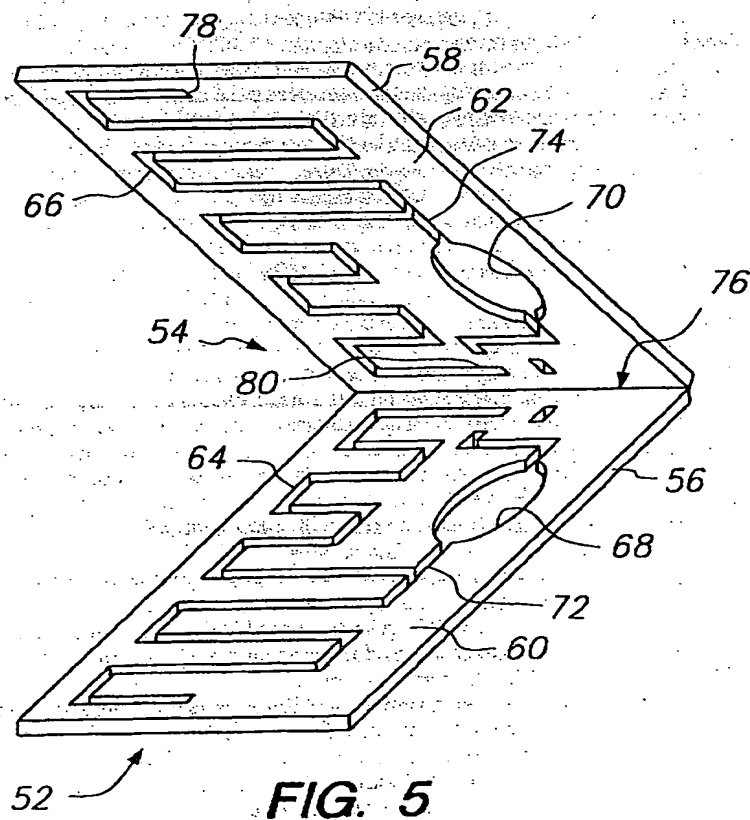
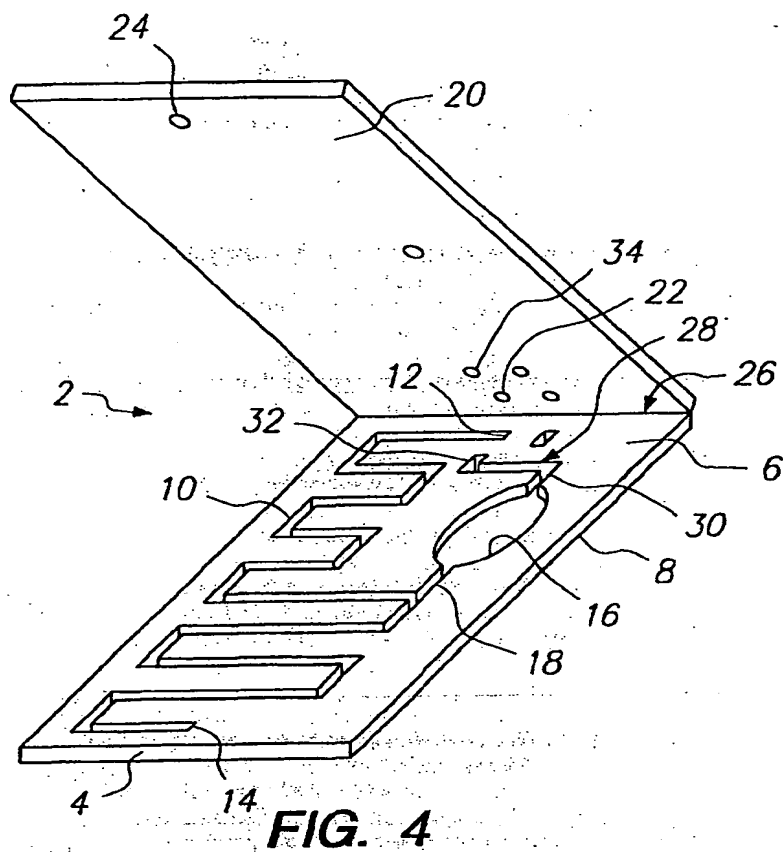
zumindest einem Einlaßtor (47) und zumindest einem Auslaßtor (49), die sich in einer Fluidkommunikation

- mit der Reaktionskammer befinden, wobei die Tore den Durchtritt eines Probenfluids von einer externen Quelle in und durch die Reaktionskammer ermöglichen, wodurch ein Fluidflußweg definiert wird, wobei das Substrat (33) und die Abdeckplatte (43) aus einem Material bestehen, das thermisch stabil und resistent gegen Biobewuchs ist;
- (b) Anlegen einer Antriebskraft an die Vorrichtung, um das Probenfluid entlang des Flußweges in die Reaktionskammer zu bewegen;
- (c) Erhitzen des Probenfluids in der Reaktionskammer, um die doppelsträngige DNA in eine einzelsträngige DNA zu trennen;
- (d) Abkühlen der Probe, um eine Hybridisierung der Primermoleküle zu entgegengesetzten Strängen der einzelsträngigen DNA und eine Replikation der einzelsträngigen DNA durch die DNA-Polymerase zu ermöglichen; und
- (e) Wiederholen der Schritte (c) und (d), um den gewünschten Grad an Vermehrung zu erzielen.
49. Das Verfahren gemäß Anspruch 48, bei dem das Substratmaterial modifiziert sein kann, um den elektroosmotischen Fluß eines fließenden Fluids, das sich in Kontakt mit demselben befindet, zu verändern.
50. Verfahren gemäß Anspruch 49, bei dem das Substratmaterial ein Polymer ist.
51. Verfahren gemäß Anspruch 50, bei dem das Material aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Polyimiden, Polycarbonaten, Polyestern, Polyamiden, Polyethern, Polyurethanen, Polyfluorokarbonen, Polystyrenen, Poly(Acrylonitril-Butadien-Styren), Polymethylmethacrylat, Polyolefinen und Copolymeren derselben besteht.
52. Verfahren gemäß Anspruch 51, bei dem das Substrat aus Polyimid besteht.
53. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 48 bis 52, bei dem die Substratoberfläche behandelt ist, um die thermische Stabilität, die chemische Stabilität und die Biobewuchsresistenz weiter zu erhöhen.
54. Verfahren gemäß Anspruch 53, bei dem die Oberflächenbehandlung die Bildung einer Polyethylenoxidschicht aufweist.
55. Verfahren gemäß Anspruch 53, bei der die Oberflächenbehandlung die Bildung einer Schicht aus Bovinserumalbumin aufweist.
56. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 48 bis 55, bei dem die Vorrichtung ferner einen zusätzlichen Hohlraum aufweist, der in der ersten planaren Oberfläche gebildet ist und in Kombination mit der Abdeckplatte eine zusätzliche PCR-Reaktionskammer bildet.
57. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 48 bis 56, bei dem die Antriebseinrichtung eine Einrichtung zum Anlegen einer Spannungsdifferenz aufweist.
58. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 48 bis 56, bei dem die Antriebseinrichtung eine Einrichtung zum Anlegen einer Druckdifferenz aufweist.
59. Verfahren zum Vermehren der Menge eines interessierenden DNA-Moleküls, das in einem kleinen Volumen eines Probenfluids enthalten ist, unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion, wobei das Verfahren folgende Schritte aufweist:
- (a) Einbringen von bis zu etwa 10 µl eines Probenfluids, das das interessierende DNA-Molekül in doppelsträngiger Form, ein erstes und ein zweites Primermolekül, die zu entgegengesetzten Strängen des DNA-Moleküls komplementär sind, eine thermostabile DNA-Polymerase, freie Desoxynucleosidtriphosphate und einen PCR-Puffer enthält, in einen Mikroreaktor, wobei der Mikroreaktor folgende Merkmale aufweist:
- ein Substrat (33) mit einer ersten und einer zweiten im wesentlichen planaren Oberfläche, die sich gegenüberliegen, wobei in der ersten planaren Oberfläche des Substrates (33) ein Hohlraum und zumindest ein Mikrokanal (39, 41) gebildet sind, und wobei der Hohlraum als eine Reaktionszone (37) dient, die sich in einer Fluidkommunikation mit jedem Mikrokanal (39, 41) befindet,
- eine Abdeckplatte (43), die über der ersten planaren Oberfläche (35) angeordnet ist, wobei die Abdeckplatte (43) in Kombination mit dem Hohlraum eine Reaktionskammer und mit jedem Mikrokanal (39, 41) eine Mikrosäule definiert, und
- zumindest ein Einlaßtor (47) und zumindest ein Auslaßtor (49), die mit der Reaktionskammer direkt oder indirekt kommunikativ verbunden sind, wobei die Tore (47, 49) den Durchtritt eines Probenfluids von einer externen Quelle in und durch die Reaktionskammer ermöglichen, wodurch ein Fluidflußweg definiert wird, wobei das Substrat (33) und die Abdeckplatte (43) aus einem Material bestehen, das thermisch stabil und resistent gegen Biobewuchs ist;
- (b) Anlegen einer Antriebskraft an die Vorrichtung, um das Probenfluid entlang des Flußweges in die Reaktionskammer zu bewegen;
- (c) Erhitzen des Probenfluids in der Reaktionskammer um die doppelsträngige DNA in eine einzelsträngige DNA zu trennen;
- (d) Abkühlen der Probe, um eine Hybridisierung der Primermoleküle zu entgegengesetzten Strängen der einzelsträngigen DNA und eine Replikation der einzelsträngigen DNA durch die DNA-Polymerase zu ermöglichen; und
- (e) Wiederholen der Schritte (c) und (d), um den gewünschten Grad an Vermehrung zu erzielen.
60. Verfahren gemäß Anspruch 59, das ferner das Sammeln des Reaktionsproduktes an dem Auslaßtor aufweist.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -





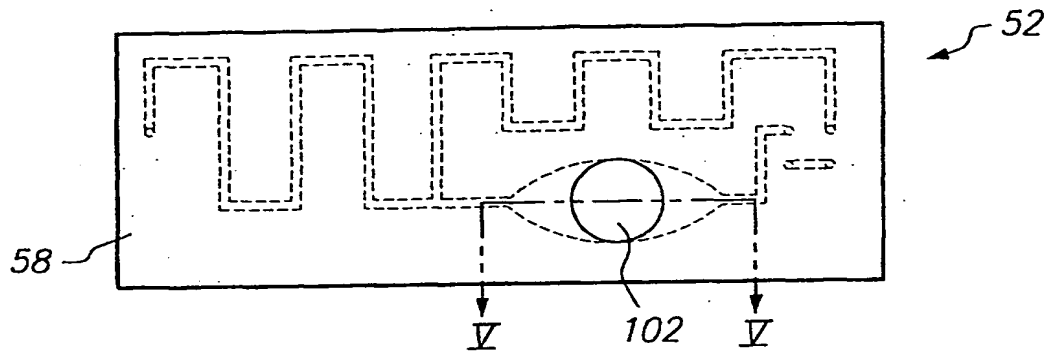


FIG. 6

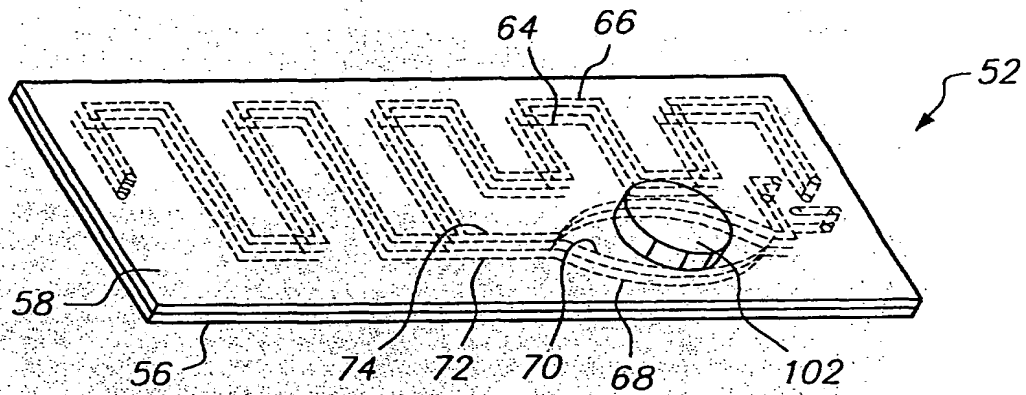


FIG. 7

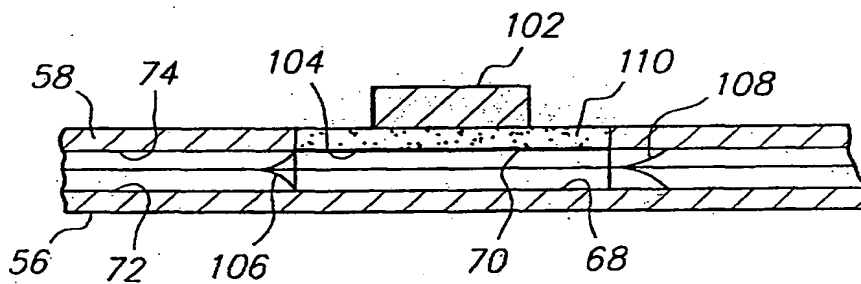
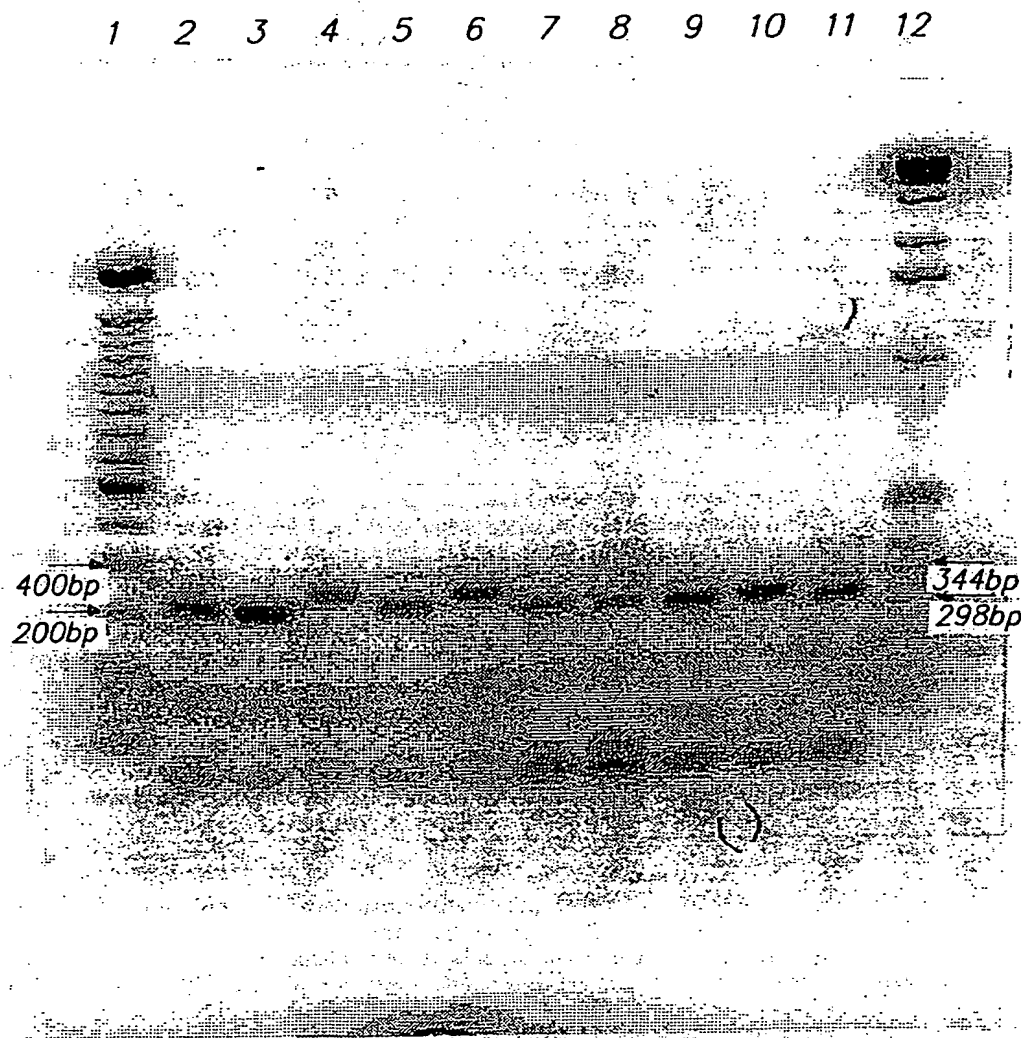


FIG. 8

FIG. 9

RapidCycler-EZ-RNA-PCR-Vergleich an verschiedenen Polyimido-
drohrleitungsbehandlungen (alle enthalten 7,5% PEG8000 während
der PCR)



2% NuSieve-3:1-Agarosa, 70V/2 Std. 45 min., 4°C; SyberGreen
I vorgefärbt

Legende

- | | |
|--------------------------|----------------------------------|
| 1) 100bp-Standard | 7) kochen/erhitzen |
| 2) 10µL-Glas | 8) kochen/EDTA/erhitzen |
| 3) 5-30µL-Glas | 9) kochen |
| 4) 1Std./95°C erhitzen | 10) kochen/EDTA |
| 5) 2,5Std./95°C erhitzen | 11) Polyethylen mit hoher Dichte |
| 6) unbehandelt | 12) 1-kbp-Standard |